

Universidad CEU San Pablo
CEINDO – CEU Escuela Internacional de
Doctorado

Programa en Medicina Traslacional



CEU

*Universidad
San Pablo*



CEU

*Escuela Internacional
de Doctorado*

**Descubrimiento de nuevos
marcadores biológicos implicados en
inflamación alérgica mediante
metabólica.**

TESIS DOCTORAL

Presentada por: David Obeso Montero

Dirigida por: Domingo Barber Hernández

Co-Dirigida por: Alma Villaseñor Solís

MADRID, 2019

TESIS DOCTORAL
DAVID OBESO MONTERO
2019

Agradecimientos

En primer lugar, dar las gracias a mi director de tesis, Domingo Barber y a mi codirectora Alma Villaseñor, por guiarme y darme todo el apoyo necesario en todo momento para completar este proyecto, que ha sido hasta la fecha el más importante de mi vida.

También quiero expresar mi gratitud a todos los compañeros del CEMBIO, en especial a Coral Barbas por permitirme realizar mi doctorado en este centro, del cual me he sentido siempre parte. Gracias también a los que me han apoyado y me han facilitado su ayuda a lo largo de estos 4 años, en especial a todos los profesores que forman o han formado parte del laboratorio: M^a Paz Martínez, M^a Ángeles López, Joanna Godzien, M^a Paz Lorenzo, Fernanda Rey-Stolle, Atonía García, Javier Rupérez, Jorge Saiz, Santiago Angulo y por supuesto a Vanesa Alonso, la técnico de laboratorio que en tantas y tantas ocasiones me ha brindado su ayuda, también agradecer a todos mis compañeros que están presentes o han formado parte del CEMBIO a lo largo de estos 4 años, en especial aquellos con los que también mantengo una relación de amistad.

También quiero expresar mi gratitud a todos los compañeros del IMMA que forman o han formado parte en algún momento y me han apoyado y me han facilitado su ayuda a lo largo de este periodo y que han sido parte imprescindible de la mayoría de mis proyectos, y con los cuales también tengo una relación de amistad.

Gracias a todos los médicos con los que he tenido la suerte de colaborar por su disponibilidad y participación, y que han sido parte esencial de los proyectos realizados.

Dar las gracias a la Universidad San Pablo CEU y a todo su personal tanto docente como no docente, por toda la ayuda brindada y hospitalidad durante los años de la realización del grado y de la tesis, y en especial a aquellas personas con las que también he

establecido una amistad. Expresar también mi gratitud a la Fundación San Pablo CEU por el apoyo económico recibido durante estos 4 años.

Mi más sincera gratitud también a Araceli Díaz Perales y todo su grupo de investigación por permitirme realizar unas prácticas en el CBGP previas a mi estancia de doctorado.

Quisiera dar las gracias también a la empresa ALK y a toda la gente que me brindó su ayuda y su apoyo durante los meses de estancia que pasé en Horsholm (Dinamarca), los cuales en todo momento me hicieron sentir parte de ellos, en especial a Kathrine Beck Sylvestersen y a Peter Sejer Andersen por haberme dirigido en el proyecto que realicé durante la estancia.

“I would also like to thank the company ALK and all the people who gave me their help and support during the months I spent in Horsholm (Denmark), which all the time made me feel part of them, especially Kathrine Beck Sylvestersen and Peter Sejer Andersen for directing me on the project I did during the stay”.

Finalmente extender mi gratitud a mi familia y amigos con los que he compartido también este viaje y que han estado presentes en cada momento.

Índice

Abreviaturas.....	9
Summary.....	11
Resumen.....	15
Introducción.....	21
Objetivos e Hipótesis.....	65
Materiales y métodos.....	66
Resultados.....	77
Discusión.....	109
Conclusiones.....	125
Proteomics.....	129
Conclusions.....	146
Lista de publicaciones científicas.....	149
Referencias.....	151

Abreviaturas

ARA, ácido araquidónico.

CoA, coenzima A.

COX, ciclooxigenasa.

CV, coeficiente de variación.

Da, dalton.

DHA, ácido docosahexaenoico.

EI, impacto electrónico.

EPA, ácido eicosapentaenoico.

ESI, ionización por electrospray.

FC, fold change (número de veces de cambio).

GC-MS, cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

Ig, inmunoglobulina.

IL, interleucina.

MS, espectrometría de masas.

MS/MS, espectrometría de masas en tándem.

m/z, relación masa-carga.

LC-MS, cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas.

LFC, lisofosfatidilcolina.

LOX, lipooxigenasa.

OPLS-DA, análisis discriminante ortogonal por mínimos cuadrados parciales.

PCA, análisis de componentes principales.

PLS-DA, análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales.

Q, analizador de cuadrupolo simple.

QC, control de calidad.

RT, tiempo de retención.

S1P, esfingosina-1-fosfato.

SI, sistema inmune.

TOF, analizador de tiempo de vuelo.

Summary

Prevalence and severity of allergic diseases have increased worldwide. To date, respiratory allergy phenotypes are not fully characterized and, along with inflammation progression, treatment is increasingly complex and expensive. Profilin sensitization and the severity of associated food allergy provide a good model to study the progression of allergic inflammation.

In recent years, the use of omics sciences has allowed to obtain a global view of biological systems. Each omic approach is specialized in screening a specific level of systems biology. In the present thesis metabolomics and proteomics have been applied to different scenarios of allergy and have provided valuable complementary information.

Therefore, the main objective of this work was to apply metabolomics in order to obtain the metabolic profile of plasma samples by combining two complementary analytical tools: liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS) and gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS).

Twenty-five individuals (aged 18-55) were recruited. All subjects provided written informed consent. The Committees of Research and Ethics approved the protocol from the four participant Hospitals. These patients had been deeply studied for oral mucosa remodeling in a previous study. From these, six subjects were non-allergic and included as controls. All patients were interviewed to establish their clinical history. Inclusion criteria for allergic patients were as follows: a positive skin prick test to profilin but negative to lipid transfer proteins, tested with commercially available extracts, and positive specific IgE to profilin (> 0.35 kU/l), but negative to both Pru p 3 and Bet v 1. Patients underwent an oral challenge using a pure profilin extract.

The clinical status of the patients was determined by their clinical history of food allergy and the outcome of the oral challenge. Patients who suffered systemic reactions affecting

several organs, such as urticaria and asthma, were phenotyped as “severe profilin-allergic patients”. Patients who presented local or subjective reactions during oral challenges, such as oral allergic syndrome (OAS), angioedema or oral pruritus, were considered as “non-severe profilin-allergic patients”.

Whole blood was drawn before the oral profilin challenge. Briefly, 20 ml of peripheral blood were collected to obtain plasma by centrifugation and PBMCs using Ficoll-Paque density gradient centrifugation. Samples were stored at -80°C until metabolomic analysis was performed.

Metabolomic profiles of plasma samples were obtained using LC-MS and GC-MS. Initially, from 615 and 506 chemical signals obtained by LC-MS in positive (LC-MS+) and negative ionization modes, respectively, 349 and 400 complied with the quality criteria. In addition, 95 metabolites per sample were obtained using GC-MS.

Data quality was assessed by clustering quality control (QC) measurements in a non-supervised model using principal component analysis (PCA) for the three techniques. Trends for all samples were examined using PCA models from the three techniques and showed no clear clustering of patients according to their clinical status. Therefore, we decided to compare the most extreme cases – individuals with a clear clinical status “non-allergic” and “severe profilin allergic patients” – to seek the differences between these groups using a partial least square discriminant analysis (PLS-DA). Therefore, in order to obtain the differences exclusively according to the class, an orthogonal partial least square discriminant analysis (OPLS-DA) model was performed selecting the best PLS-DA model from the three data sets. The LC-MS+ model showed the best quality parameters. The OPLS-DA cross-validated model showed good quality parameters ($R^2 = 0.99$, $Q^2 = 0.75$) and was validated using the “1/3-out” approach, showing a prediction accuracy of 92%. This model was used to assign a class to “non-severe profilin-allergic patients”. Consequently, four groups were stratified: “non-allergic”, “mild”, “moderate”, and “severe”. To sum up, the model allowed the classification of “non-severe profilin-allergic patients” that could not be properly classified in the oral challenge setup. For LC-

MS data, logarithmic transformation and center scaling were used, whereas for GC-MS, autoscaling (UV) was applied to all variables. Robustness of the models was evaluated based on R^2 (explained variance) and Q^2 (capability of prediction) scores.

Then, samples were plotted according to their metabolomic classification using a PCA model, which showed a clear tendency to separate the “mild” group from the “severe” and “moderate” groups. Furthermore, aiming to show the differences between groups, discriminant analysis using PLS-DA was performed for each pair of groups. The results produced at least one model for each pairwise comparison with high-quality parameters. These results demonstrated that there are metabolic differences between the groups.

After multivariate analysis, significant variables were selected using univariate analysis. Overall, results suggest that there are specific features which can characterize each phenotype, especially the “severe” group. Once significant features in LC-MS were found, identification through MS/MS fragmentation was performed. Together with GC-MS metabolites, a total of 74 compounds were listed, encompassing carbohydrates, sphingolipids, lysophospholipids, carnitines, amino acids, fatty acids, and organic acids.

Differences among the experimental groups were tested using the non-parametric Kruskal-Wallis test with a Benjamini-Hochberg (BH) correction to identify potential biomarkers. Additionally, significant differences between “mild vs severe” and “moderate vs severe” obtained using Mann Whitney U test with a BH p value correction were added, to improve the biological interpretation. Statistical significance was set at 95% level ($p < 0.05$).

The general observed changes in the “severe” group were as follows: decreased levels of hexoses, pentoses, pyruvate, and sphinganine-C17; an increase along severity in the levels of most lysophosphocholines (LPCs), S1P, sphinganine-1-phosphate, and lactate. Furthermore, fatty acids such as myristic and lauric acid were diminished in “mild” and “moderate”, and increased in the “severe” group.

Together these results point to an alteration of the energy metabolism as well as changes in sphingolipid and lysophospholipid pathways.

On the other hand, as an additional aim of this thesis, proteomics was used to develop and optimize a method to quantify in a single tube the complete kinetics of the different allergen specific antibodies. Furthermore, this method was applied in serum samples from allergic patients treated with two types of immunotherapy.

The method was successfully optimized and applied in clinical trial samples. After analyzing the kinetics followed by IgE and IgG4 in the two types of immunotherapy using this method, the results obtained by the traditional method with ImmunoCAP were in concordance.

Resumen

La prevalencia y gravedad de las enfermedades alérgicas ha ido aumentando progresivamente en todo el mundo. Hasta la fecha, los fenotipos de alergia respiratoria no están completamente caracterizados y, junto con la progresión de la inflamación, el tratamiento es cada vez más complejo y costoso. La sensibilización a profilina y la gravedad de la alergia alimentaria asociada a ella, proporciona un buen modelo para el estudio de la progresión de la inflamación alérgica.

En los últimos años, el uso de las ciencias ómicas ha permitido obtener una visión global de los sistemas biológicos. Cada enfoque ómico está especializado en la detección de un nivel específico de la biología de sistemas. En la presente tesis, se han aplicado la metabolómica y la proteómica a diferentes escenarios de alergia proporcionando una información complementaria muy valiosa.

Por lo tanto, el objetivo principal de este trabajo ha sido la aplicación de la metabolómica para obtener el perfil metabólico en muestras de plasma combinando dos herramientas analíticas complementarias: cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

Para conseguir este objetivo se reclutaron veinticinco individuos (de 18 a 55 años). Todos los sujetos dieron su consentimiento informado por escrito, y los Comités de Investigación y Ética aprobaron el protocolo de los cuatro hospitales participantes. Estos pacientes han sido estudiados en detalle para el remodelado de la mucosa oral en un trabajo previo. De estos, seis sujetos no eran alérgicos y se incluyeron como controles. A todos los pacientes se les entrevistó para establecer su historia clínica. Los criterios de inclusión para pacientes alérgicos fueron los siguientes: una prueba de punción cutánea positiva para profilina, pero negativa para proteínas de transferencia de lípidos, llevada

a cabo con extractos disponibles comercialmente e IgE específica positiva para profilina ($> 0,35$ kU/l), pero negativa para Pru p 3 y Bet v 1. Los pacientes se sometieron a una provocación oral utilizando un extracto puro de profilina.

El estado clínico de los pacientes se determinó en base a su historial clínico de alergia alimentaria y al resultado de la provocación oral. Los pacientes que sufrieron reacciones sistémicas y que afectaron a varios órganos, como urticaria y asma, fueron fenotipados como "pacientes graves con alergia a profilina". Los pacientes que presentaron reacciones locales o subjetivas durante la provocación, como el síndrome de alergia oral (SAO), angioedema o prurito oral, se consideraron "pacientes no graves alérgicos a profilina".

Las muestras de sangre se extrajeron antes de la provocación oral con profilina. Se recogieron 20 ml de sangre periférica para obtener plasma por centrifugación y PBMCs (células mononucleares de sangre periférica) utilizando una centrifugación en gradiente de densidad, Ficoll-Paque. Las muestras se almacenaron a -80°C hasta la realización del análisis metabólico.

Los perfiles metabólicos de las muestras de plasma se obtuvieron utilizando LC-MS y GC-MS. Inicialmente, se obtuvieron 615 y 506 señales químicas en LC-MS en ionización positiva (LC-MS +) y negativa, respectivamente, de las cuales 349 y 400 señales cumplieron con los criterios de calidad. Además, se obtuvieron 95 metabolitos por muestra mediante GC-MS.

La calidad de los datos se evaluó mediante la agrupación de las medidas del control de calidad (QC) en un modelo no supervisado, utilizando el análisis de componentes principales (PCA), para las tres técnicas. Se examinaron las tendencias para todas las muestras utilizando modelos PCA de las tres técnicas y no mostraron una agrupación

clara de los pacientes de acuerdo con su estado clínico. Por lo tanto, se decidió comparar los casos más extremos, es decir, los individuos con un claro estado clínico, los "no alérgicos" y los "pacientes con alergia grave a profilina", para buscar las diferencias entre estos grupos utilizando un análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA). Por lo tanto, para obtener las diferencias exclusivamente según la clase, se realizó un modelo de análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales ortogonales (OPLS-DA) seleccionando el mejor modelo PLS-DA de los tres conjuntos de datos. El modelo de LC-MS + mostró los mejores parámetros de calidad. El modelo de validación cruzada del OPLS-DA mostró también parámetros de buena calidad ($R^2 = 0.99$, $Q^2 = 0.75$) y fue validado utilizando el enfoque de "1/3 fuera", mostrando una precisión de predicción del 92%. Este modelo se utilizó para asignar una clase al grupo de "pacientes no graves alérgicos a profilina". En consecuencia, las muestras de este grupo se estratificaron en: "no alérgicos", "leves", "moderados" y "graves". En resumen, el modelo permitió la clasificación de los "pacientes no graves alérgicos a la profilina" que no pudieron clasificarse adecuadamente mediante la provocación oral. Para los datos de LC-MS, se utilizó la transformación logarítmica y el escalado centrado, mientras que para GC-MS, se aplicó el autoescalado (UV) a todas las variables. La robustez de los modelos se evaluó en base a los parámetros R^2 (capacidad de clasificación) y Q^2 (capacidad de predicción).

Después, las muestras se representaron de acuerdo con su clasificación metabólica utilizando un modelo de PCA, mostrando una clara tendencia a separar el grupo "leve" de los grupos "grave" y "moderado". Además, con el objetivo de mostrar las diferencias entre los grupos, se realizó un análisis discriminante utilizando PLS-DA para cada par de grupos. Los resultados produjeron al menos un modelo para cada comparación con parámetros de alta calidad. Estos resultados demostraron que existen diferencias metabólicas entre los grupos.

Tras realizar el análisis multivariante, las variables significativas se seleccionaron mediante análisis univariante. En general, los resultados sugirieron que hay

características específicas que pueden caracterizar cada fenotipo, especialmente al grupo "grave". Una vez que se encontraron las entidades significativas en LC-MS, se realizó la identificación mediante fragmentación por MS/MS. Junto con los metabolitos de GC-MS, se encontraron un total de 74 compuestos, que incluyen carbohidratos, esfingolípidos, lisofosfolípidos, carnitinas, aminoácidos, ácidos grasos y ácidos orgánicos.

Las diferencias entre los grupos experimentales se analizaron utilizando el test estadístico no paramétrico de Kruskal-Wallis con una corrección de Benjamini-Hochberg (BH) para identificar posibles biomarcadores. Además, se añadieron las diferencias significativas entre las comparaciones de "leve frente a grave" y "moderado frente a grave" obtenidas mediante la prueba U de Mann Whitney con una corrección del p valor BH, para mejorar la interpretación biológica. La significación estadística se estableció en un nivel del 95% ($p < 0,05$).

Los cambios generales observados en el grupo "grave" fueron los siguientes: una disminución de los niveles de hexosas, pentosas, piruvato y esfinganina-C17; un aumento junto con la gravedad en los niveles de la mayoría de las lisofosfocolinas (LPC), S1P, esfinganina-1-fosfato y lactato. Además, los ácidos grasos como el ácido mirístico y el ácido láurico disminuyeron en "leve" y "moderado", y aumentaron en el grupo "grave".

En conjunto, estos resultados apuntan a una alteración del metabolismo energético, así como a cambios en las rutas de esfingolípidos y lisofosfolípidos.

Por otro lado, y como objetivo adicional de esta tesis, se utilizó proteómica para desarrollar y optimizar un método para cuantificar en un solo tubo, la cinética completa de los diferentes anticuerpos específicos de alérgeno. Además, este método se aplicó en muestras de suero de pacientes alérgicos tratados con dos tipos de inmunoterapia.

El método fue optimizado y se aplicó con éxito en las muestras del ensayo clínico. Después de analizar la cinética de la IgE e IgG4 en los dos tipos de inmunoterapia utilizando este método, se comprobó que los resultados obtenidos por el método tradicional utilizando immunoCAP estaban en concordancia.

Introducción

Marco Teórico y definiciones previas

Las enfermedades alérgicas constituyen un claro problema de salud pública a nivel mundial. En las últimas décadas se ha producido tanto un aumento en la prevalencia como en la gravedad de las patologías alérgicas especialmente en el asma alérgico, la alergia alimentaria y la alergia a medicamentos y según las previsiones, su incidencia aumentará tanto a medio como largo plazo¹. Todo este panorama trae consigo un incremento de la demanda sanitaria con el consiguiente impacto sobre la salud pública y los recursos sanitarios disponibles. El desconocimiento de las enfermedades alérgicas junto a la falta de un diagnóstico y tratamiento adecuados conduce a una clara disminución en la calidad de vida relacionada con la salud, al aumento de las complicaciones, de la mortalidad, y a un incremento considerable en los costes, de los que se hablará en el siguiente apartado. Por todo ello, profundizar en su conocimiento y difundirlo es una tarea indispensable.

Coste que ocasionan las enfermedades alérgicas

El constante crecimiento de la prevalencia de las enfermedades alérgicas conlleva una serie de costes que influyen en diversos aspectos y que se detallan a continuación:

-En primer lugar, una serie de costes económicos derivados del tratamiento, visita al médico, medicamentos, visitas a servicios de urgencias, análisis y pruebas diagnósticas, hospitalizaciones, etc.

-En segundo lugar, los derivados de los síntomas que producen las enfermedades alérgicas, como la pérdida de trabajo productivo, disminución del rendimiento laboral, pérdida de capacidad productiva o pérdida de trabajo productivo por asistencia a familiares.

-Por último, los de tipo personal, para quien padece la enfermedad: como son el dolor, el malestar, miedo, tristeza o el sufrimiento².

Por tanto, con el fin de disminuir al máximo esta serie de costes, se vuelve a recalcar la necesidad de profundizar tanto en el estudio de las enfermedades alérgicas como en la identificación de nuevas estrategias de prevención y tratamiento de la patología.

Alergia y alérgenos, definiciones

La alergia podría definirse como una respuesta desmedida del sistema inmune (SI), denominada reacción de hipersensibilidad. Esta reacción ocurre cuando un individuo identifica como peligrosas determinadas sustancias inocuas, (pólenes de plantas, ácaros del polvo, determinados alimentos, etc.) que se denominan alérgenos. Un alérgeno es, por tanto, una sustancia que produce una reacción de hipersensibilidad en un individuo. Estas sustancias desencadenan en los pacientes alérgicos una serie de acontecimientos inflamatorios que ocurren tanto en piel como mucosas y que originan los diferentes signos y síntomas de las enfermedades alérgicas².

Bioquímicamente, los alérgenos suelen ser proteínas, y habitualmente se encuentran unidas a otras biomoléculas como carbohidratos o lípidos (conocidas como glicoproteínas y lipoproteínas, respectivamente) aunque también algunos carbohidratos pueden también actuar como alérgenos. Existen varios tipos de alérgenos y varias formas de clasificarlos. En la figura 1 se describen las más habituales³.

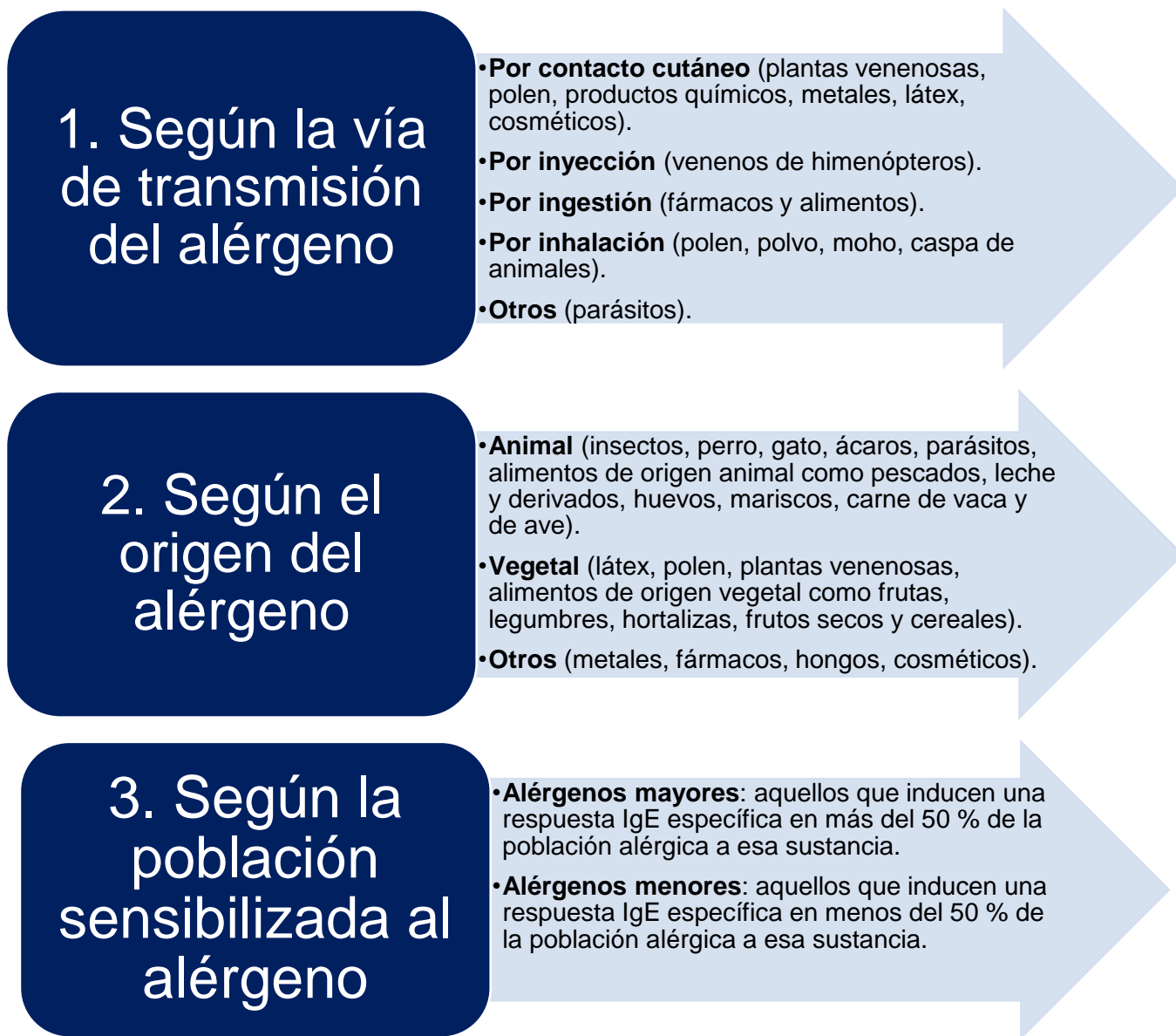


Figura 1: Clasificaciones más habituales de los alérgenos.

Etiología de las enfermedades alérgicas

Las causas de las enfermedades alérgicas son diversas (Figura 2). Existen alteraciones inmunitarias y factores genéticos que predisponen a los individuos, y una serie de factores desencadenantes. En primer lugar, existen alteraciones del sistema inmune que hacen que los individuos tengan mayor predisposición, como pueden ser diferentes infecciones víricas respiratorias en edades tempranas. Respecto a los factores

genéticos, la herencia genética es muy importante hasta el punto que, si uno de los progenitores es alérgico, la probabilidad de que su descendiente padezca alergia es aproximadamente una de cada dos, en cambio, si ambos progenitores son alérgicos, la probabilidad se acerca a tres de cada cuatro¹.

Por otro lado, en las últimas décadas se han ido postulando diferentes hipótesis sobre el incesante crecimiento de las enfermedades alérgicas en el mundo occidental, siendo la “hipótesis de la higiene” una de las que ha cobrado más protagonismo, aunque no ha sido aceptada en su totalidad por la comunidad científica.

En sus inicios, esta hipótesis postulaba que el motivo del gran crecimiento en la incidencia de las enfermedades alérgicas era la disminución de la incidencia de enfermedades infecciosas en países occidentales y posteriormente en países en vías de desarrollo. Los ejemplos iniciales que apoyaban esta teoría fueron infecciones fecales- orales endémicas por patógenos virales, bacterianos o protozoicos. Después, esta hipótesis pasó a incluir no solo microorganismos patógenos sino también comensales y simbioses. Más tarde acabó extendiéndose a las enfermedades inflamatorias en general. Esta hipótesis basada en datos epidemiológicos mostraba que, los sujetos que migraban de un país de baja incidencia a un país de alta incidencia adquirían estas enfermedades inmunitarias con una alta incidencia en su primera generación. Sin embargo, la correlación entre la alta incidencia de la enfermedad y el alto nivel socioeconómico no demostraba un vínculo causal entre las infecciones y los trastornos inmunitarios. Los estudios iniciales en los que se basaba la hipótesis de la higiene eran modelos animales y, en menor grado, estudios de intervención en humanos. Los mecanismos subyacentes son múltiples y complejos y podrían originarse, en cierta medida, por cambios en la microbiota causados por cambios en el estilo de vida, particularmente en enfermedades inflamatorias del intestino⁴.

La microbiota, que se define como el conjunto de microorganismos que establecen una relación simbiótica con el individuo, es otro de los factores implicados que más fuerza ha

ido cogiendo en los últimos años. Esta se localiza en ambientes específicos en el humano como son la piel, la orofaringe, y los tractos gastrointestinal y genitourinario, entre otros. En la alergia, la microbiota de los pacientes sufre una disbiosis, que se define como una alteración en la composición de las comunidades comensales residentes respecto a las encontrada en individuos sanos⁵.

Si la diversidad en la microbiota representa una mayor probabilidad de encontrar microorganismos protectores o si es un reflejo de una exposición ambiental equilibrada, sigue siendo difícil de definir. La hipótesis de la higiene ha sido una herramienta útil para abordar diversos fenómenos relacionados con la respuesta inmune desproporcionada, y ha contribuido a la comprensión del impacto de la microbiota en la salud humana, sin embargo, sus límites deben ser reconocidos⁴.

Recientemente se han publicado trabajos y revisiones que evidencian el cambio significativo en el pensamiento en los últimos 25 años, mostrando que, la interacción de los microorganismos ambientales y la microbiota humana, con nuestro sistema inmune, desempeña un papel esencial en la regulación inmunitaria, promoviendo una tolerancia para el sistema inmunitario que puede tener un impacto contra el desarrollo de enfermedades alérgicas. Los cambios en el estilo de vida y el ambiente, junto con la rápida urbanización, han contribuido a los cambios en nuestra exposición a microorganismos esenciales. Además, los cambios en la dieta y el abuso de antibióticos han tenido efectos perjudiciales sobre el contenido y diversidad de la microbiota humana. En conjunto, estos factores han tenido efectos muy marcados en el sistema inmune, que probablemente contribuyeron a la aparición de las enfermedades alérgicas⁶.

Aparte de los factores que predisponen y en función de los factores ambientales, el individuo se sensibiliza a determinadas sustancias con capacidad de producir una

respuesta inmunitaria de hipersensibilidad y posteriormente alergia, pudiendo ocurrir esta sensibilización en cualquier etapa de la vida.

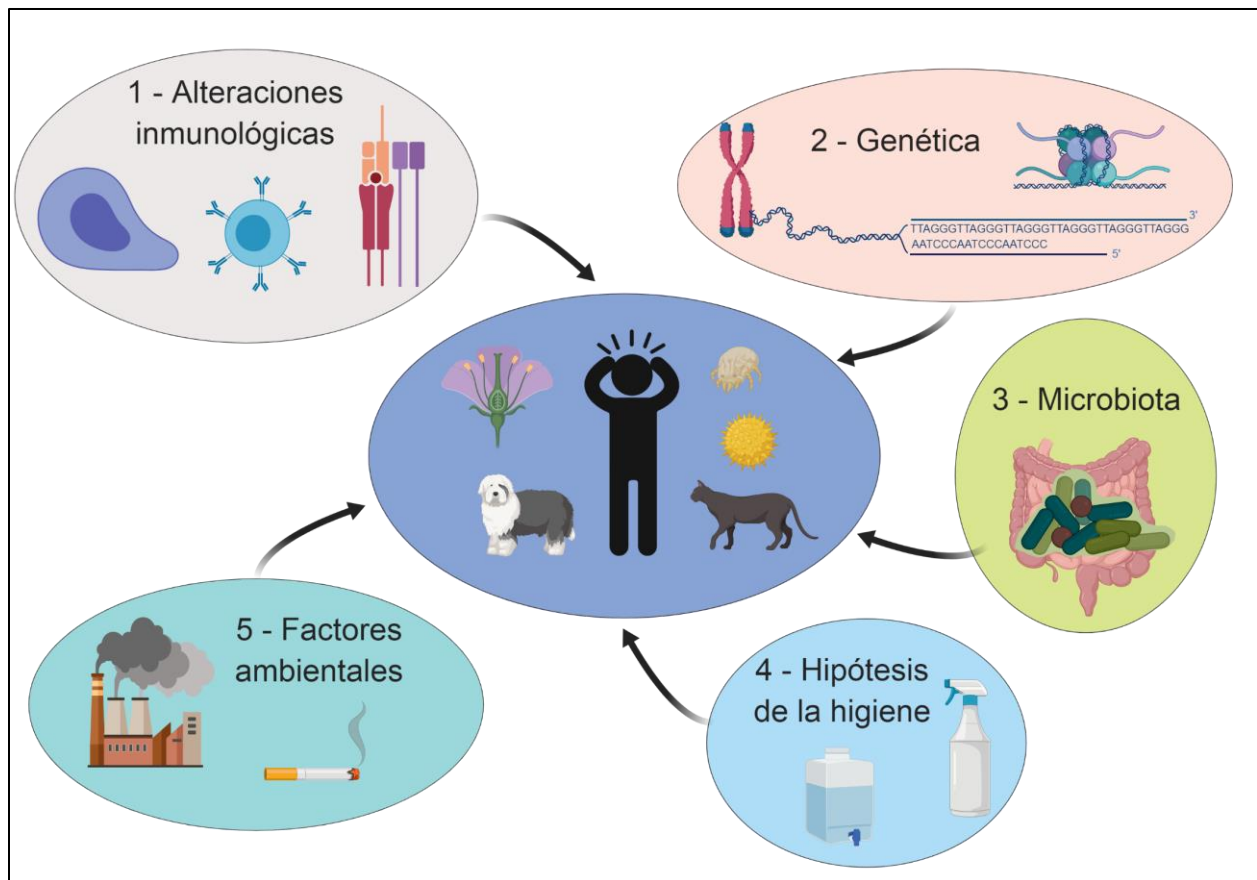


Figura 2: Esquema de los diferentes factores que están relacionados con el origen de las enfermedades alérgicas.

Los múltiples factores involucrados, incluyendo aquellos que no están directamente asociados con la microbiota (exposición al alérgeno, genética, contaminación, etc.) hacen que sea imposible evaluar la contribución de cada factor. Por lo tanto, la clave quizás resida en los efectos combinados de los cambios en el estilo de vida, junto con una dieta mejorada y un uso controlado y responsable de los antibióticos⁷.

Respuesta del sistema inmune en la alergia

El SI en su conjunto está formado por una serie de órganos, tejidos, células y moléculas derivadas, que se encuentra ampliamente distribuido por el organismo. Los órganos que forman parte del SI se denominan órganos linfoides (adenoides, amígdalas palatinas, apéndice, bazo, ganglios linfáticos, médula ósea, timo, placas de Peyer y vasos linfáticos). También se localiza en las mucosas del aparato digestivo, respiratorio y genitourinario. Todos ellos contribuyen a la producción, maduración y activación de las células inmunes. La misión principal del SI es la protección del individuo mediante el reconocimiento y la defensa. Se encarga de reconocer, permanentemente, aquello que es propio y forma parte del organismo (tejidos, células), de lo que es ajeno a él y, potencialmente, dañino. Además, es un complejo sistema defensivo frente a agresiones y ataques, tanto externos al organismo (bacterias, virus), como internos (células degeneradas o tumorales)⁸.

Se calcula que la variedad de posibles sustancias contra las cuales el SI debe reaccionar de forma específica, llamadas genéricamente antígenos, es de más de 100, produciendo tan variado número de anticuerpos diferentes como sea preciso, al poseer una habilidad muy específica para discriminar entre moléculas muy similares. Además, el SI tiene memoria, de tal forma que puede reconocer rápidamente una segunda exposición a un antígeno contra el cual se ha generado anteriormente una respuesta⁸.

Como se ha descrito anteriormente una de las funciones del SI es la capacidad de distinguir, dentro de lo exógeno, aquello que no supone ningún peligro para el organismo. Y es precisamente este mecanismo el que no funciona en la alergia. Como consecuencia de esta alteración del SI, y al encontrarse distribuido por todo el organismo, las enfermedades alérgicas pueden producir síntomas en cualquier órgano del cuerpo, aunque sean más frecuentes los problemas respiratorios, digestivos o de la piel, debido a que éstas son las zonas de mayor contacto con agentes externos⁸. A continuación, en la tabla 1 se describen las células más importantes del SI relacionadas con la alergia:

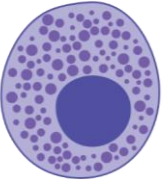




		Descripción	Localización	Función
Mastocitos		Células que se caracterizan por su capacidad de poder fijar moléculas de IgE en el exterior de su membrana plasmática.	Están ampliamente distribuidos en aparato respiratorio, piel, hueso, aparato digestivo y tejido nervioso.	Los mastocitos son células que poseen numerosos gránulos en su interior, llenos de moléculas proinflamatorias, principalmente histamina.
Basófilos		Al igual que los mastocitos, cuentan con receptores en su superficie para unir la IgE.	Son el tipo de leucocitos que se encuentran en menor cantidad circulando por la sangre.	Poseen gránulos en su interior repletos de sustancias tóxicas.
Linfocitos T		Los linfocitos T constituyen normalmente un 20% de los linfocitos. Existen varios tipos de linfocitos T dependiendo de las moléculas de superficie que presentan, de las sustancias que secretan y de su función principal.	Los linfocitos T son linfocitos producidos en la médula ósea y que luego maduran en el timo. Circulan por la sangre.	Se especializan en la secreción de citoquinas para la regulación del sistema inmunitario.
Linfocitos B		Los linfocitos B constituyen entre un 5 y un 15% del total de linfocitos y dan origen a las células plasmáticas.	El desarrollo de linfocitos B se lleva a cabo en el hígado durante la etapa fetal y en la médula ósea a partir del nacimiento y hasta la muerte. Circulan por la sangre.	Encargados de la producción de los anticuerpos al dar origen a las células plasmáticas.
Eosinófilos		Células que se caracterizan por tener un núcleo bilobulado y poseer gránulos citoplásmicos.	Tienen una vida media en la circulación sanguínea de 3 a 4 días antes de migrar a los tejidos en donde permanecen durante varios días.	Defensa contra infecciones parasitarias, defensa contra bacterias intracelulares, modulación de las reacciones de hipersensibilidad inmediata.

Tabla 1: Células del sistema inmune más importantes en las enfermedades alérgicas. **Nota:** IgE: Inmunoglobulina E.

Por otro lado, se encuentran las citoquinas, que son productos solubles, de tiempo de acción corto, responsables de la comunicación intercelular. Son responsables de la regulación de la respuesta inmune en general, y de la alérgica en particular. Las citoquinas son producidas por diferentes tipos de células que participan en la respuesta inmune, principalmente por los linfocitos T. Vamos a destacar cuatro fenotipos de linfocitos, los Th0 o linfocitos precursores, que son los que se van a diferenciar en uno de los otros tres fenotipos. Los otros tres fenotipos son responsables del tipo de respuesta inmune y son: los linfocitos Th1 (respuesta frente a microorganismos y parásitos intracelulares), los linfocitos Th2 (respuesta frente a helmintos y alérgenos) y los linfocitos Th17 (respuesta frente a bacterias extracelulares y hongos). Hay que destacar que, en condiciones normales, hay un equilibrio entre la respuesta Th1y Th2. Además, se han identificado un gran número de citoquinas y muchas de ellas son cruciales para el desarrollo de los linfocitos y para el tipo de respuesta inmune. Un tipo de citoquinas particular son las interleucinas, muchas de ellas están altamente implicadas en las respuestas alérgicas (Tabla 2). Así, en la rinitis o el asma bronquial alérgico, se origina una alteración en el equilibrio entre los linfocitos Th1 y Th2, a favor de los Th2, ya que se produce un incremento de Interleucina-4 (IL-4), que va a favorecer el desarrollo de la respuesta alérgica. Por el contrario, los linfocitos Th1 producen principalmente interferón gamma (IFN- γ) que neutraliza la respuesta de la IL-4 y de los linfocitos Th2⁸.

Las sustancias liberadas de las células que intervienen en las reacciones alérgicas son las responsables últimas de los síntomas que sufre el paciente alérgico. Las dos sustancias derivadas de las células de SI más importantes en las reacciones alérgicas son la histamina y la triptasa:

-Histamina. Uno de los principales mediadores de la inflamación alérgica. Es el producto más abundante, se encuentra en los gránulos de mastocitos y en menor cantidad en los basófilos. La respuesta biológica a la liberación de la histamina es: el picor cutáneo, por estimulación de los nervios; la dilatación y aumento de la permeabilidad de los vasos sanguíneos, con lo que se produce calor y enrojecimiento de la piel y de las mucosas, y

salida de líquido hacia los tejidos de alrededor, con lo que se origina un edema; y la contracción de la musculatura de los bronquios, que causa dificultad para respirar y mayor producción de moco en las vías respiratorias. Debido a todos estos efectos que produce la histamina, los antihistamínicos son los fármacos más empleados en el tratamiento de los síntomas de las enfermedades alérgicas⁸.

-Triptasa. Sustancia sintetizada por los mastocitos que se libera durante las reacciones alérgicas. Su determinación en la sangre u orina es utilizada para establecer la existencia de reacciones alérgicas debidas a la activación de estas células⁸.

Nombre	Origen	Función
IL-1	Monocitos, células endoteliales, epitelios y fibroblastos.	Activación de linfocitos T, inducción de síntesis de prostaglandinas por el endotelio, proliferación y diferenciación de linfocitos B, síntesis de GM-CSF e IL-4 por linfocitos T.
IL-2	Linfocitos T activados.	Proliferación y diferenciación de linfocitos T, activación de células NK, proliferación de linfocitos B y síntesis de inmunoglobulinas, estímulo para linfocitos T citotóxicos, estímulo para fagocitos.
IL-4	Linfocitos T fenotipos Th2/Th0, mastocitos y basófilos, linfocitos B.	Diferenciación de linfocitos T a Th2, crecimiento y diferenciación de linfocitos B, inducción de síntesis de IgE, estímulo de endotelio y fibroblastos.
IL-5	Linfocitos T, fibroblastos, endotelio.	Crecimiento y diferenciación de eosinófilos, quimiotaxis y activación de eosinófilos, proliferación de linfocitos B, estímulo de secreción de IgA.
IL-6	Linfocitos T, fibroblastos, endotelio.	Desarrollo de megacariocitos, diferenciación de linfocitos B a plasmocitos, síntesis hepática de proteínas de fase aguda.
IL-9	Linfocitos T fenotipos Th2/Th0.	Estímulo de mastocitos, crecimiento de linfocitos T.
IL-10	Linfocitos T, algunos linfocitos B, monocitos, queratinocitos y células dendríticas.	Inhibición de la presentación del antígeno por macrófagos, activación de linfocitos B, inhibición de la secreción de citoquinas proinflamatorias.
IL-13	Linfocitos T, mastocitos y basófilos.	Producción de IgG4 e IgE, crecimiento y diferenciación de linfocitos B, inhibición de citoquinas proinflamatorias.

IL-17	Linfocitos T fenotipo Th17.	Actúa sobre células epiteliales, endoteliales, fibroblastos, y otras células inmunes, activando una respuesta inflamatoria local, produciendo péptidos antimicrobianos y atrayendo células al lugar de inflamación.
-------	-----------------------------	---

Tabla 2: Origen y función de las principales interleucinas.

Nota: **IL:** Interleucina, **GM-CSF:** Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor, **NK:** Natural Killer, **IFN:** Interferon, **IgG4:** Inmunoglobulina G4, **IgE:** Inmunoglobulina E, **IgA:** Inmunoglobulina A.

Los anticuerpos o inmunoglobulinas

Una de las moléculas más importantes del sistema inmune, son los anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig), que son proteínas que circulan por la sangre sintetizadas por el sistema inmune, en concreto por los linfocitos B. Existen varios isotipos de inmunoglobulinas: G, A, M, D y E. Las Ig son generadas por el sistema inmune como una respuesta de defensa contra los microorganismos y sustancias exógenas que penetran en el organismo. Si estas sustancias externas son reconocidas por el sistema inmune como no perjudiciales, resultan toleradas y se producen Ig del tipo G. Por el contrario, las personas alérgicas además de producir Ig del tipo G, producen Ig del tipo E (IgE)⁸.

La IgE es una clase de Ig denominada así porque forman parte de su estructura unas cadenas llamadas Épsilon. La IgE es la que se encuentra en menor concentración en la sangre, pero a pesar de ello, resulta ser la más importante en la resistencia y lucha contra las enfermedades parasitarias, sobre todo en las producidas por gusanos helmintos. La IgE posee la capacidad de activar unas células que contienen en su interior productos muy tóxicos y sustancias letales, capaces de eliminar a tales parásitos. La concentración de IgE en la sangre periférica se eleva notablemente cuando se desarrollan las enfermedades alérgicas⁸.

Las reacciones alérgicas

Las reacciones alérgicas se denominan reacciones de hipersensibilidad inmediatas. Tras tener un primer contacto con el alérgeno se produce una captación de éste por parte de unas células llamadas células presentadoras de antígeno, que lo fagocitan en su interior y lo presentan a los linfocitos T, que a su vez interactúan con los linfocitos B, los cuales producen IgE específica frente a ese antígeno concreto. Esta IgE se unirá a los mastocitos y basófilos que contienen receptores para éste en su superficie. Hasta aquí, el individuo no experimenta signos ni síntomas de la alergia⁸. (Figura 3).

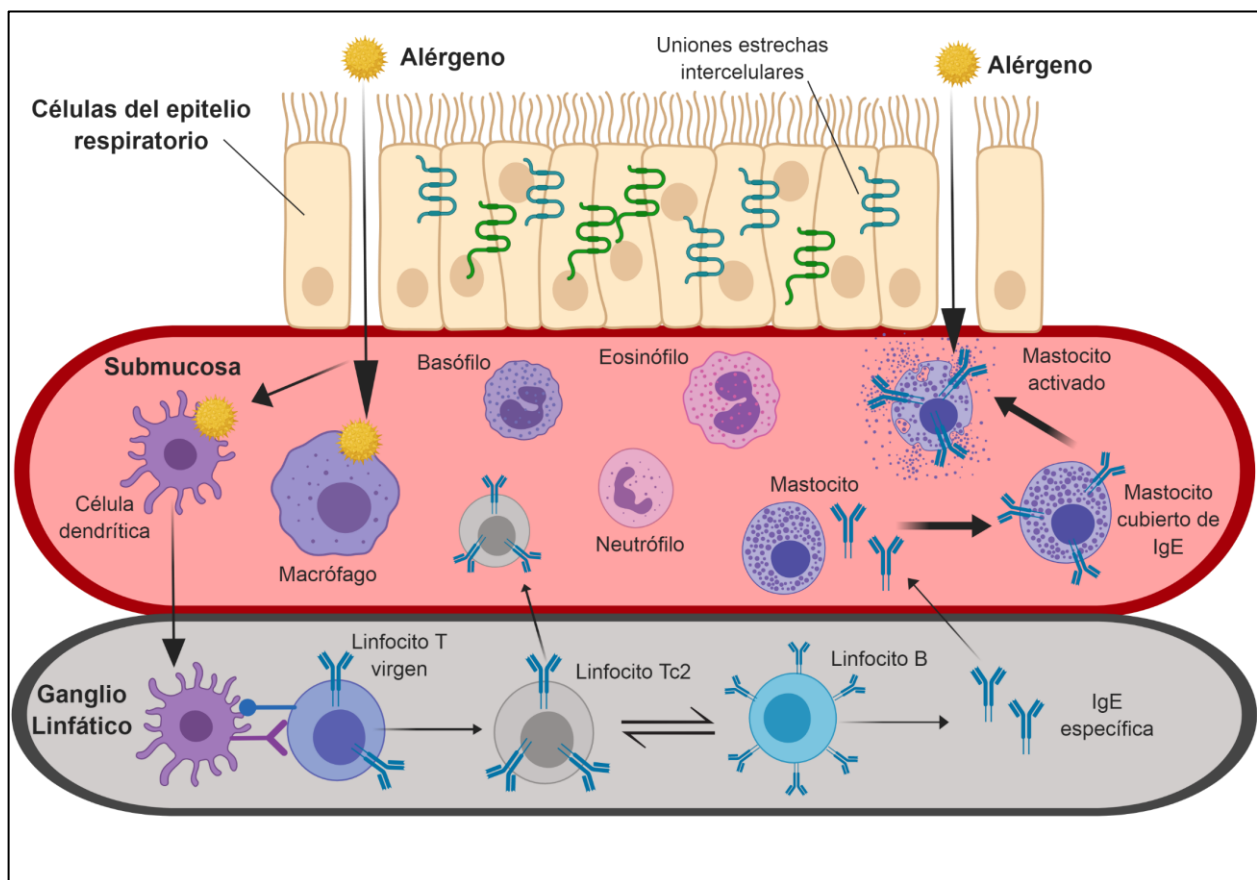


Figura 3: Esquema de una reacción alérgica.

Este proceso puede durar varios días, meses o años y se denomina sensibilización (el individuo se hace sensible a ese alérgeno). Este es el punto de inflexión a partir del cual el individuo se ha hecho alérgico. Es algo muy importante, ya que, aunque se nazca con predisposición genética para hacerse alérgico, la enfermedad no se desarrollará si no se

ha estado durante un cierto tiempo en contacto con el alérgeno responsable. Esto determina algo fundamental que será común en todas las enfermedades de causa alérgica: la imposibilidad de presentar síntomas en una primera exposición o contacto⁸.

Bioquímica de la inflamación

En un proceso inflamatorio se desencadenan una serie de reacciones químicas y celulares en el área dañada, que determinan grandes cambios vasculares como vasodilatación e incremento de la permeabilidad, estos acontecimientos están regulados exclusivamente por mediadores químicos, principalmente histamina, leucotrienos, IL-1, y TNF. Simultáneamente a los cambios vasculares, tiene lugar el desplazamiento de leucocitos desde la luz vascular hacia la zona afectada. De los mediadores químicos, la IL-1 y el TNF tienen gran relevancia al provocar las reacciones de fase aguda, tienen efectos endoteliales, y efectos sobre los fibroblastos (células del tejido conectivo) y leucocitos. Los signos de la inflamación están determinados por el papel de varios mediadores de la inflamación, así el dolor es causado principalmente por la actividad de prostaglandinas, bradicinina y sustancia P (neuropéptido); el calor, por la hiperemia (aumento de sangre) en el sitio de lesión como consecuencia de vasodilatación; el rubor, por la propia hiperemia y el aumento del volumen, por la aparición del edema⁹.

Por otro lado, todas las células que participan en la inflamación necesitan obtener energía para desarrollar sus funciones, ya que requieren de grandes cantidades de energía para activarse en cortos periodos de tiempo, por lo que es normal que durante estas activaciones se modifique su metabolismo energético, es decir, las reacciones del catabolismo¹⁰.

El catabolismo es la parte del proceso metabólico que consiste en la degradación de nutrientes orgánicos transformándolos en productos finales simples, con el fin de extraer de ellos energía química y convertirla en una forma útil para la célula. La energía liberada por las reacciones catabólicas es usada en la síntesis del ATP (adenosín trifosfato)¹¹.

A continuación, se pasan a describir algunos de los metabolitos que están más implicados en los procesos inflamatorios.

El ácido araquidónico y sus eicosanoides derivados

El ácido araquidónico (ARA), es un ácido graso poliinsaturado de la serie omega-6, que puede obtenerse directamente de la dieta o ser sintetizado endógenamente a partir de su precursor dietario, el ácido linoleico, mediante reacciones enzimáticas sucesivas al final de las cuales se pliega sobre sí mismo en forma de horquilla y se ubica en la membrana plasmática de muchas células en los diversos sistemas biológicos y donde sirve a su vez como el principal precursor de los eicosanoides, una familia de mediadores lipídicos que incluyen; protanoides (como por ejemplo prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos), leucotrienos y lipoxinas, los que actúan de forma autocrina/paracrina acoplados a receptores específicos, desempeñando importantes papeles en fisiología y patofisiología, principalmente en inflamación. El ARA es metabolizado principalmente mediante dos vías enzimáticas principales: ciclooxigenasa (COX) y lipooxigenasa (LOX) (Figura 4), aunque también existe otra vía enzimática por el citocromo P-450 epoxigenasa (CYP450)¹².

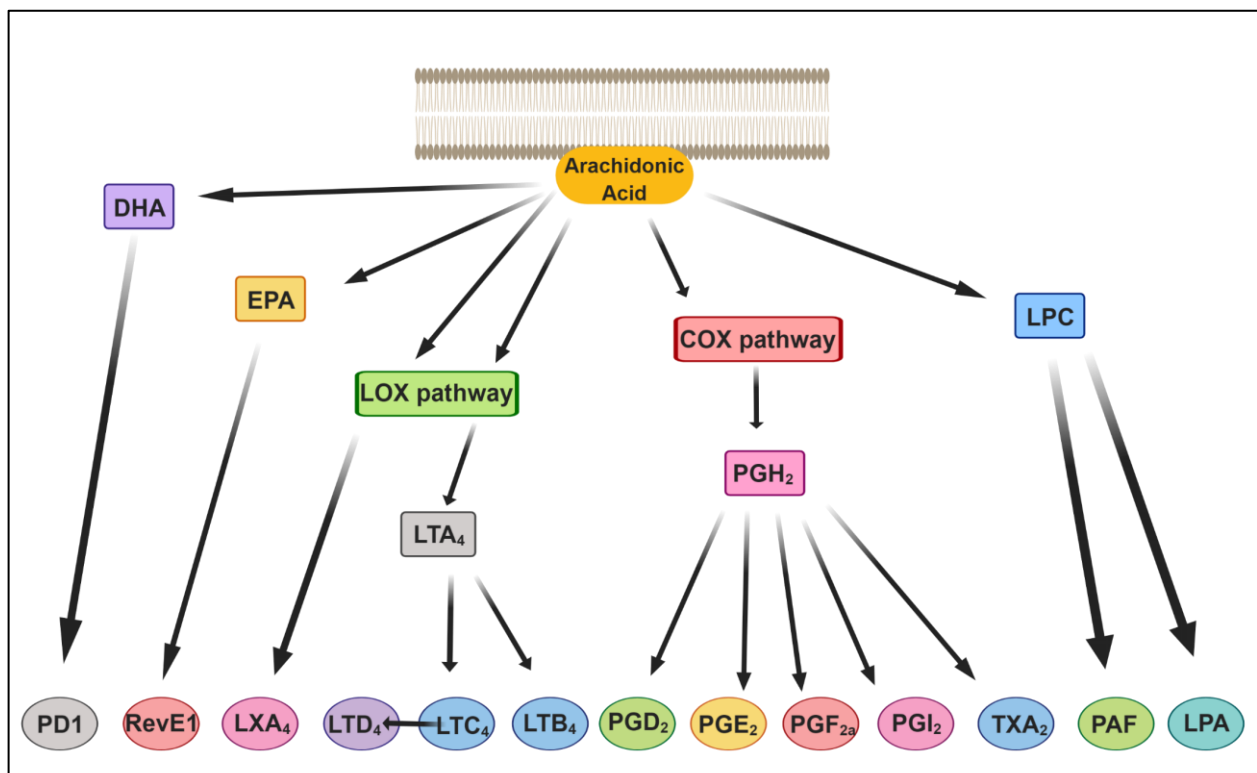


Figura 4: Esquema de los diferentes metabolitos derivados del ácido araquidónico.

Nota: **DHA:** ácido docosahexaenoico, **EPA:** ácido eicosapentaenoico, **LOX:** lipooxigenasa, **COX:** ciclooxigenasa, **LPC:** lisofosfatidilcolina, **PD1:** protectina D1, **RevE1:** resolvina E1, **LXA₄:** lipoxina A4, **LTD₄:** leucotrieno D4, **LTC₄:** leucotrieno C4, **LTB₄:** leucotrieno B4, **PGD₂:** prostaglandina D2, **PGE₂:** prostaglandina E2, **PGF_{2A}:** prostaglandina F2A, **PGI₂:** prostaciclina, **TXA₂:** tromboxano A2, **PAF:** factor activador de plaquetas, **LPA:** ácido lisofosfatídico.

Los leucotrienos (LT) son moléculas derivadas del ARA por la acción oxidativa de la enzima LOX. Deben su nombre al hecho de que se aislaron originalmente a partir de los leucocitos y a que contienen cuatro enlaces dobles conjugados en su estructura hidrocarbonada. La oxidación del ARA por la vía de la LOX da lugar a diferentes LT de la serie 4 (LTA₄, LTB₄, LTC₄, LTD₄, LTE₄; el 4 indica la presencia de 4 enlaces dobles en total). Cabe destacar que, los LT son producidos fundamentalmente por mastocitos (no se encuentran en sus gránulos, su producción y secreción se inicia en una fase más tardía después de la degranulación) y por los leucocitos que llegan al sitio de la lesión, por lo que, a diferencia de otros mediadores, los LT ejercen su efecto más tarde en la inflamación, sin embargo, este es notablemente mayor que la histamina y son responsables de prolongar el aumento de la permeabilidad vascular en las venas. Los LT son constrictores extremadamente potentes de la musculatura lisa, como las presentes en las vías aéreas periféricas de los pulmones, a las que son muy sensibles, por lo cual es posible relacionar este tipo de sustancias con las dificultades respiratorias de los pacientes asmáticos⁹.

Las prostaglandinas (PGs) son un conjunto de sustancias de carácter lipídico derivadas de eicosanoides, que contienen un anillo de ciclopentano y constituyen una familia de mediadores celulares, con efectos diversos. Las PGs actúan sobre diferentes sistemas del organismo, incluyendo el sistema nervioso, el tejido liso, la sangre y el sistema reproductor; juegan un papel importante en la regulación de diversas funciones como la presión sanguínea, la coagulación de la sangre, la respuesta inflamatoria alérgica y la actividad del aparato digestivo. Las PGs en un proceso inflamatorio son las causantes

del dolor, en el caso particular de la PGE2 se sabe que esta es hiperalgésica, es decir, que sobre la piel hace que se desarrolle hipersensibilidad frente a los estímulos dolorosos⁹.

La prostaciclina (o PGI₂) es uno de los miembros de la familia de los eicosanoides. La prostaciclina es sintetizada por las células endoteliales y mastocitos, a partir de la prostaglandina H₂ (PGH₂). Las prostaciclinas actúan principalmente previniendo la formación y agregación plaquetaria en relación con la coagulación de la sangre. Es también un vasodilatador eficaz. En el caso de la inflamación, en la génesis de la dilatación arteriolar están implicados mediadores químicos producidos por el endotelio vascular y elementos celulares del tejido como los mastocitos, dentro de dichos mediadores se encuentran las prostaglandinas, especialmente la PGI₂. Esta actúa uniéndose a receptores H₁ del músculo liso arteriolar y del endotelio vascular provocando respectivamente relajación de las fibras lisas y aumento de la permeabilidad⁹.

Los tromboxanos son un conjunto de moléculas con efecto autocrino y paracrino, y son el resultado principalmente de la acción de la enzima COX sobre el ARA. El proceso de síntesis del tromboxanos es producido únicamente en las membranas de las plaquetas. La síntesis de tromboxano A₂ (TXA₂) contribuye a la agregación plaquetaria, por medio de su activación en la hemostasia actuando como un potente agregante plaquetario y vasoconstrictor. En el sistema respiratorio el TXA₂ además es un potente broncoconstrictor^{12,13}.

Derivados de ácido eicosapentaenóico (EPA) y ácido docosahexaenóico (DHA). Son ácidos grasos esenciales, obtenidos principalmente de la dieta. Entre los omega-3 mejor estudiados se encuentran el ácido graso α -linolénico y dos de sus metabolitos; el EPA y el DHA, a los que se le atribuyen muchas propiedades antiinflamatorias en humanos, incluyendo el modular el proceso inflamatorio en las reacciones alérgicas. Estos efectos derivan en parte de su capacidad para competir con el ARA en la producción de mediadores lipídicos de menor potencia inflamatoria, acción antiinflamatoria, resolución

de la inflamación y en suprimir varias funciones en células de la inmunidad innata y adaptativa. Estos mediadores lípidos de menor potencia inflamatoria son las resolvinas, lipoxinas, maresinas y protectinas, entre otros.

Resolvinas: Son una familia de mediadores lipídicos generados a partir de los ácidos grasos Ω 3 por las vías LOX, COX-2 y citocromo P450 epoxigenasa durante la inflamación pulmonar, donde exhiben acciones antiinflamatorias, resolutorias de la inflamación, antifibróticas, antiangiogénicas, antiinfecciosas y antihiperalgésicas. A nivel molecular se han caracterizado dos series de resolvinas llamadas E y D, por derivar de EPA y DHA, respectivamente, los cuales actúan como agonistas naturales sobre receptores específicos para ejercer sus acciones¹⁴.

Protectinas: Reciben el nombre de protectinas de la serie D, por ser metabolitos oxigenados generados a partir de DHA en un primer paso por vía 15-LOX, donde es convertido rápidamente en el intermediario 17S-HPDHA (ácido 17S-hidroxi-peroxidocosahexaenóico), el cual sufre una conversión posterior vía citocromo P450 epoxigenasa hasta PD1 en humanos en focos de inflamación aguda¹⁵.

Maresinas: Como único representante de este grupo se encuentra el ácido 7R,14S-dihidroxi-docosa-4Z,8E,10E,12Z,16Z,19Z-hexaenoico, conocido como Maresina 1 (MaR1), quien deriva de DHA mediante conversiones sucesivas vía 12-LOX y 15-LOX, en macrófagos activados residentes en sitios de inflamación aguda¹⁶.

Lipoxinas: Son eicosanoides generados por reacciones de oxigenación secuencial a partir del ARA vía 15-LOX y 5-LOX durante la inflamación, donde ejercen potentes efectos antiinflamatorios y resolutores de la inflamación. Entre sus efectos se encuentran el bloquear la quimiotaxis, migración transepitelial y transendotelial de neutrófilos, impedir la degranulación del neutrófilo, estimular en macrófagos la actividad fagocítica

de neutrófilos apoptóticos y el regular a la baja la producción de citoquinas proinflamatorias en células del epitelio bronquial humano¹⁷.

Tratamiento de la alergia

El tratamiento de la alergia debe partir del concepto de que las enfermedades alérgicas están causadas por una reacción inmune alterada frente a un agente externo y son, en realidad, enfermedades crónicas que presentan reagudizaciones. Por tanto, se debe evitar realizar exclusivamente un tratamiento sintomático de las manifestaciones agudas. Un tratamiento correcto debe incluir tres pilares: evitación del alérgeno, tratamiento farmacológico y modificación de la respuesta inmune alterada.

Evitación del alérgeno

Debe ser el primer pilar del tratamiento, especialmente en situaciones en que el alérgeno puede ser evitado, como es el caso de alimentos y fármacos. Hay que tener en cuenta que alimentos o fármacos de la misma familia o similar estructura química, pueden producir síntomas y también deben evitarse. Los alérgenos inhalados como ácaros, pólenes, hongos o epitelios de animales son más difíciles de evitar y requieren medidas específicas para cada uno de ellos.

Tratamiento farmacológico

Se realiza sobre el órgano diana y debe incluir tratamiento de mantenimiento (generalmente antiinflamatorio) y tratamiento de los síntomas agudos que pueden aparecer tras el contacto intenso con el alérgeno. El tratamiento farmacológico varía según el órgano afectado: son comunes el uso de antihistamínicos en la rinoconjuntivitis alérgica, así como glucocorticoides locales (nebulizados), que consiguen un efecto antiinflamatorio potente con escasos efectos adversos. En el asma también se utilizan los glucocorticoides locales (inhalados) como fármacos de mantenimiento, aunque frecuentemente se asocian con broncodilatadores. También se utilizan otros fármacos

como los antileucotrienos, que también producen un efecto antiinflamatorio. En las lesiones dérmicas se utilizan los antihistamínicos, aunque con una eficacia variable. La presencia simultánea de síntomas alérgicos graves y generalizados como son ahogos, hipotensión, taquicardia, angioedema y urticaria tras la ingesta de un alimento o la administración de un fármaco se denomina anafilaxia y exige tratamiento intensivo que, en muchas ocasiones requerirá el uso de adrenalina intramuscular. También puede ser necesario el uso de adrenalina tras una reacción anafiláctica tras picadura de insectos en pacientes sensibles.

Inmunoterapia con alérgenos

La modificación de la respuesta inmune alterada es muy útil en pacientes diagnosticados de alergia respiratoria (rinoconjuntivitis y asma), en los que es muy difícil evitar el contacto con el alérgeno, por la ubicuidad de este (pólenes, ácaros, epitelios de animales u hongos) y en pacientes alérgicos a veneno de insectos.

En ambos casos se ha demostrado que el uso de inmunoterapia con alérgenos es capaz de modificar las alteraciones del sistema inmune de los pacientes alérgicos en distintos niveles y mejorar los síntomas de forma consistente y prolongada. El uso de este tratamiento debe realizarse por personal especializado y tras un diagnóstico alergológico riguroso que objetive el agente causante de los síntomas. La inmunoterapia consiste en la administración controlada progresiva (vía subcutánea o sublingual) de un extracto purificado del alérgeno responsable de los síntomas del paciente, buscando que su organismo se vaya habituando o se vuelva "tolerante" al alérgeno poco a poco. Previamente al inicio de un tratamiento con inmunoterapia, se deben realizar unas consideraciones previas, como: objetivar que la alergia está mediada por IgE y que la sensibilización encontrada es la responsable de los síntomas, el alérgeno al cual está sensibilizado debe estar estandarizado, valorar la gravedad y duración de los síntomas, la dificultad para la eliminación del alérgeno, la ausencia de contraindicaciones para su

uso, además de tener en cuenta otros factores, como los socioeconómicos (coste, cumplimiento terapéutico, etc.)¹⁸.

Existen varios tipos de inmunoterapia o vacunas de alergia, en general se administran inicialmente de forma semanal o varios días y una vez alcanzada la dosis de mantenimiento, se hace mensualmente, siendo necesario habitualmente que la vacuna se haga durante 3-5 años ya que su efecto curativo es lento y progresivo. Es la única terapia capaz de modificar el curso natural de las enfermedades alérgicas. Además, como en todas las enfermedades crónicas, en el tratamiento del paciente alérgico se debe incluir aspectos educativos, que incluya las características de su enfermedad, sus posibilidades terapéuticas y las peculiaridades del alérgeno causante de su sintomatología. Por ello, en todo paciente con sospecha de enfermedad de origen alérgico debe realizarse un estudio alergológico completo, que debe ser la base de todas las decisiones terapéuticas posteriores¹⁹.

Alergia respiratoria a gramíneas y modelo de profilina

En los últimos años se ha producido un importante avance en el conocimiento de las estructuras moleculares implicadas en la generación de la alergia en las fuentes naturales como el polen y en su relación con la alergia alimentaria²⁰⁻²⁴. En la alergia producida por gramíneas (principal causa de alergia estacional a nivel mundial), los pacientes reconocen principalmente dos alérgenos del polen de gramíneas (Phl p 1 y Phl p 5). Diversos estudios epidemiológicos realizados en España han permitido identificar patrones distintos de progresión de esta patología ligada a la distinta exposición alergénica^{25,26}. En el caso de la alergia a gramíneas, hasta el 60% de los pacientes expuestos a altas concentraciones de polen, como ocurre en Extremadura y en algunas áreas de Castilla-León, se sensibilizan a alérgenos menores, como profilina, hecho que provoca a su vez el desencadenamiento de síndromes de alergia alimentaria por reactividad cruzada polen-alimentos. Además, los pacientes sensibilizados a profilina presentan niveles de IgE más altos a alérgenos mayores y elevada complejidad en el

reconocimiento a alérgenos de polen de gramíneas. Recientemente, se ha descubierto que algunos de los pacientes con una mayor exposición a polen de gramíneas desarrollan patologías alimentarias graves a profilina, hecho que hasta la fecha se consideraba muy improbable. Estos pacientes constituyen de hecho la población alérgica ideal para estudiar la relación entre alergia respiratoria y alimentaria. Las reacciones de estos pacientes pueden ir desde reacciones locales intensas: edemas intensos de úvula, odinofagia hasta sistémicas: como reacciones anafilácticas e hipotensión.

La profilina es un alérgeno muy lábil y se había considerado capaz de inducir solo reacciones leves, tipo síndrome de alergia oral, y por lo tanto era un alérgeno alimentario irrelevante desde el punto de vista clínico. Los datos señalados anteriormente, dado que el alérgeno se degrada rápidamente en medio ácido, sugieren que la vía de acceso de la mucosa oral, al menos en pacientes concretos, es una vía de acceso eficaz de alérgenos alimentarios y supone de hecho un nuevo paradigma en el estudio de la alergia alimentaria²⁷.

La profilina es en consecuencia, un alérgeno completo tanto respiratorio²⁸, como alimentario y constituye un modelo único para estudiar la evolución de la inflamación alérgica. Recientemente otros autores han señalado la implicación de las modificaciones en la función de barrera epitelial en el desencadenamiento de la alergia^{29,30}. Asimismo, se han descrito alteraciones de la barrera epitelial de la vía aérea ligada a alergia respiratoria causada por polen de gramíneas³¹⁻³³. En un estudio previo de nuestro grupo de investigación se ha descrito por primera vez el remodelado epitelial que sufren estos pacientes alérgicos a profilina en estas áreas de alta exposición al polen de gramíneas. Concluyéndose que los pacientes con alergia grave a la profilina presentan un extenso remodelado de la barrera epitelial, pérdida de uniones estrechas, aumento de la sensibilidad al test de basófilos, aumento de IL-33 y periostina (ambos marcadores de remodelado epitelial), lo que podría permitir la penetración de la profilina en la mucosa oral y la inducción de inflamación local³⁴.

La búsqueda de biomarcadores: dificultad de fenotipar al paciente

Hasta la fecha, no hay biomarcadores disponibles para realizar una caracterización completa de los fenotipos de la inflamación alérgica. La búsqueda de estos biomarcadores permitirá mejorar los tratamientos actuales de los pacientes al poder personalizar los tratamientos y hacerlos más precisos³⁵.

Los hallazgos iniciales en la búsqueda de potenciales biomarcadores en diferentes campos relacionados con la inflamación alérgica mediante nuevas técnicas han producido resultados prometedores en diferentes subtipos de alergia, basados principalmente en los buenos criterios de estratificación de los individuos en los estudios. Sin embargo, todavía hay más trabajo pendiente en este campo. Los resultados encontrados en animales deben estar correlacionados en humanos y más investigación debe llevarse a cabo en modelos humanos³⁶.

Se espera que en un futuro cercano una combinación de diferentes marcadores brinde la oportunidad de controlar las afecciones alérgicas y predecir si un paciente responderá a un tratamiento específico.

Nuevas técnicas de estudio de enfermedades multifactoriales

La metabolómica es la ciencia ómica más reciente y se encarga del estudio de metabolitos, que son los compuestos finales o intermediarios del metabolismo presentes en un medio biológico y de bajo peso molecular (<1500 Da). A través del análisis diferencial comparado del metaboloma, que es el conjunto de metabolitos de una determinada muestra biológica, se pueden buscar, entre otros, marcadores de diagnóstico o de pronóstico de una enfermedad, de su evolución ante un tratamiento o una dieta, del mecanismo de acción o de la potencial toxicidad de un fármaco³⁷.

El análisis de los metabolitos de una determinada muestra biológica se puede enfocar principalmente de dos modos distintos: en un análisis dirigido, donde se analiza uno o un grupo reducido de compuestos preseleccionados; y en un análisis no dirigido, centrado en la obtención de la mayor cantidad de metabolitos posibles en la muestra. La metabolómica utiliza dos técnicas analíticas principalmente como la espectrometría de masas (MS) o la resonancia magnética nuclear, ya que son las técnicas que permiten la elucidación estructural de los compuestos de una mezcla compleja. Además, la MS se acopla habitualmente a métodos de separación como cromatografía de líquidos (LC-MS), cromatografía de gases (GC-MS) y electroforesis capilar (CE-MS) ya que este acoplamiento supone la separación de los compuestos de las mezclas complejas y permite la determinación del peso molecular con alta resolución gracias a la posibilidad de separar los componentes de la mezcla según transcurre el análisis.

El principal desafío del análisis de los metabolitos radica en su heterogeneidad y en su distinta concentración en los sistemas biológicos, por tanto, el uso de diferentes herramientas analíticas y métodos novedosos de tratamiento de muestra es crucial para la detección de la mayor cantidad de metabolitos presentes. Otro aspecto muy importante en un estudio metabolómico es la aplicación de la quimiometría al tratamiento de los datos. El análisis de las muestras produce una ingente cantidad de datos que solo mediante la utilización de métodos matemáticos y estadísticos se puede manejar y resolver, para proporcionar información biológica valiosa y fiable a partir de muestras complejas. Por todo ello el flujo de trabajo que se sigue habitualmente en un análisis no dirigido en metabolómica, y que es el que ha sido utilizado en este trabajo, se encuentra descrito en forma gráfica en la figura 5. Cada uno de los pasos del flujo de trabajo serán explicados con más profundidad en las siguientes páginas³⁸.

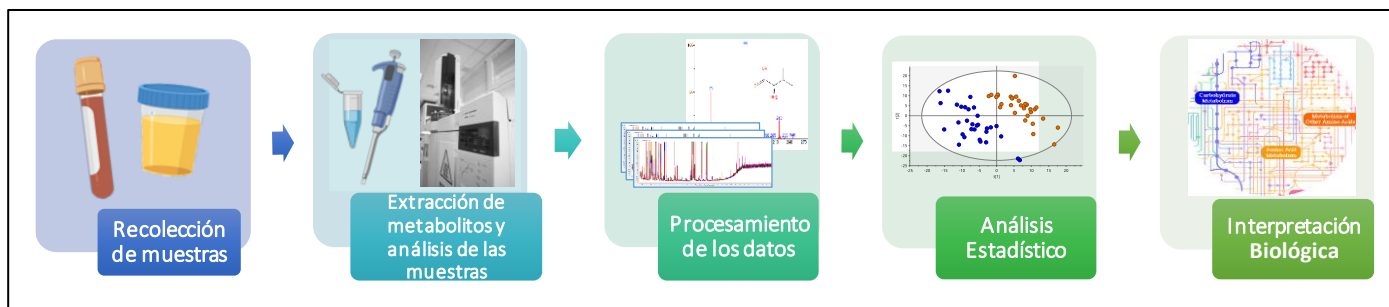


Figura 5: Flujo de trabajo seguido en un análisis no dirigido en metabolómica.

Extracción de metabolitos

La extracción de metabolitos es una etapa crítica en el flujo de trabajo de metabolómica, ya que va a afectar directamente al tipo y a la calidad de los datos finales. Así, en una aproximación no dirigida la extracción no requerirá ser selectiva ya que tiene el propósito de obtener una fracción representativa del metaboloma de una muestra biológica. La etapa de extracción de metabolitos tiene como objetivos:

- Aislar eficientemente los metabolitos de la muestra.
- Eliminar interferencias que puedan dificultar el análisis como, por ejemplo, sales y proteínas.
- Conseguir un extracto compatible con la técnica analítica a utilizar.
- Concentrar los metabolitos presentes a nivel de trazas antes del análisis cuando sea necesario, ya que como se ha mencionado anteriormente, la selectividad de la etapa de extracción dependerá del objetivo del estudio.

En nuestro caso particular, el análisis metabolómico de plasma está limitado por la presencia de una elevada concentración de proteínas que también interfieren en la detección de metabolitos. Por esta razón, es necesaria una etapa de precipitación de proteínas mediante un cambio brusco de pH o utilizando disolventes orgánicos como acetonitrilo (ACN) o metanol³⁹.

Análisis de las muestras: técnicas analíticas

Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC-MS)

La cromatografía de líquidos (LC) es una técnica analítica que permite separar físicamente los distintos componentes de una solución por la adsorción selectiva de los componentes de una mezcla. En toda cromatografía existe un contacto entre dos fases, una fija que se llama fase estacionaria, y una móvil, denominada fase móvil, la cual está en contacto con la fase estacionaria y va a permitir la separación de los componentes de la mezcla según la afinidad de estos con una u otra fase. La fase móvil que contiene los analitos penetra a través de la fase estacionaria en una dirección definida, en el caso de este trabajo la fase estacionaria fue una columna cromatográfica. Es necesaria además una presión alta para lograr un caudal constante y asegurar así la reproducibilidad del análisis. Las sustancias que permanecen más tiempo libres en la fase móvil avanzan más rápidamente con el flujo de esta, y las que quedan más unidas a la fase estacionaria o retenidas, avanzan menos y por lo tanto tardarán más en eluir, es decir saldrán de la columna en diferentes momentos (diferentes tiempos de retención).

Según las polaridades de la fase móvil y de la fase estacionaria se distingue:

Cromatografía en fase normal: esta cromatografía utiliza una fase estacionaria polar y una fase móvil apolar, y se utiliza cuando el compuesto de interés es bastante polar. La fuerza de absorción aumenta a medida que lo hace la polaridad del compuesto y la interacción entre el compuesto polar y la fase estacionaria polar (en comparación a la fase móvil) aumenta el tiempo de retención. La utilización de disolventes más polares en la fase móvil disminuye el tiempo de retención de los compuestos mientras que los disolventes más hidrofóbicos tienden a aumentar el tiempo de retención. Las fases estacionarias más comunes de este tipo de cromatografía son las que tienen grupos funcionales como ciano, amino o diol.

Cromatografía en fase inversa: que consiste una fase estacionaria apolar y una fase móvil de polaridad moderada. Una de las fases estacionarias más comunes de este tipo de cromatografía es la C-18 o la C-8 (cadenas de 18 u 8 carbonos, respectivamente). El

tiempo de retención es mayor para las moléculas de naturaleza apolar, mientras que las moléculas de carácter polar eluyen más rápidamente, es decir salen a tiempos de retención más bajos.

La MS es una técnica de análisis que permite analizar con gran precisión la composición de diferentes elementos químicos e isótopos atómicos, separando los núcleos atómicos en función de su relación masa/carga (m/z). Para ello utiliza un espectrómetro de masas, el cual tiene tres componentes fundamentales: la fuente de ionización, el analizador de masa y el detector.

-Fuente de ionización

La fuente de ionización es el elemento del espectrómetro que ioniza el material por analizar (el analito). Después los iones son transportados hasta el analizador de masa mediante campos magnéticos o eléctricos.

Las técnicas de ionización han sido críticas para la determinación de las muestras que se pueden analizar por MS. Las dos técnicas utilizadas más menudo con líquidos y muestras biológicas sólidas, son la ionización por electrospray (ESI), la cual se explicará posteriormente en detalle y la desorción/ionización por láser asistida por una matriz (MALDI), respectivamente.

En los dispositivos de LC-MS la fuente ionización se encuentra en la interfaz que transfiere eficientemente los componentes separados de la columna LC a la fuente de iones MS. La interfaz es necesaria porque los dispositivos LC y MS son fundamentalmente incompatibles. Mientras que la fase móvil en un sistema LC es un líquido presurizado, los analizadores de MS generalmente operan al vacío (alrededor de 10^{-6} torr). Por lo tanto, no es posible bombear directamente el fluido desde la columna LC a la fuente MS. En general, la interfaz es una parte mecánicamente simple del sistema LC-MS que transfiere la cantidad máxima de analito, elimina una parte significativa de la fase móvil utilizada en la LC y preserva la identidad química de los productos de la

cromatografía (químicamente inerte). Como requisito, la interfaz no debe interferir con la eficiencia ionizante y las condiciones de vacío del sistema MS.

Una de las interfaces y fuente ionización más comunes es ESI. Esta es una fuente de iones de MS que facilitan la transición de un entorno de alta presión (HPLC) a condiciones de alto vacío necesarias en el analizador de MS.

Ionización por electrospray (ESI)

Esta fuente de iones puede usarse para el análisis de moléculas moderadamente polares (*por ejemplo*, metabolitos, xenobióticos o péptidos).

En ESI, la muestra en disolución pasa a través de un capilar metálico, en cuya punta se aplica un potencial de 3 a 4 KV y una presión de 1 atmósfera. Para evitar la contaminación, este capilar generalmente se ubica perpendicular a la entrada del sistema MS. Se produce entonces, una fina niebla de gotitas de elevada carga y la evaporación del solvente por el calor generado por el potencial eléctrico hace que aumente la densidad de carga, produciéndose la desorción en fase gaseosa.

El análisis por ESI, se puede hacer provocando una ionización positiva o negativa. Se selecciona la polaridad de los iones que se desea analizar mediante el voltaje del capilar. Permite la obtención del ion molecular, y si se desea obtener una fragmentación, se puede inducir aumentando el voltaje en la punta del cono del capilar. La ionización por ESI constituye la mejor interfaz cuando se acopla la LC o la CE con MS.

-Analizador de masa

Los diferentes tipos de espectrómetros de masas varían según el analizador que tienen. Además de los clásicos analizadores de área magnética, existen otros tipos de analizadores actualmente mucho más utilizados como son el de tiempo de vuelo, la trampa de iones, el cuadrupolo sencillo y los analizadores de masa de resonancia ciclotrónica de ion de transformada de Fourier (FTICR). Además de estos, existen otros analizadores e híbridos de combinaciones.

Analizador de tiempo de vuelo (TOF del inglés “*Time-of-flight*”)

Es un analizador de masas en el que la relación m/z de un ion se determina a través de una medición de tiempo de vuelo. Los iones son acelerados por un campo eléctrico de fuerza conocida. Esta aceleración hace que un ion tenga la misma energía cinética que cualquier otro ion con la misma carga. La velocidad del ion depende de su relación m/z por lo que se mide el tiempo que tarda el ion en alcanzar un detector a una distancia conocida.

El tiempo que tarda en recorrer cierta distancia depende de la intensidad del campo y de su relación m/z . Por tanto, al ionizar una molécula, los iones con menor masa y mayor carga alcanzarán en primer lugar el detector, mientras que los más pesados tardarán más en llegar. A partir de esta relación y los parámetros experimentales conocidos (el potencial eléctrico aplicado y la distancia a recorrer) se puede identificar el ion.

Analizador de cuadrupolo sencillo (Q del inglés “*quadrupole*”)

El analizador de masas de cuadrupolo sencillo (Q-MS), consta de cuatro varillas cilíndricas, colocadas paralelamente entre sí. Los iones se separan en un cuadrupolo en función de la estabilidad de sus trayectorias en los campos eléctricos oscilantes que se aplican a las varillas. Cada par de varillas opuestas se conecta eléctricamente, y se aplica una tensión de radiofrecuencia entre una pareja de varillas y la otra. Los iones viajan por el cuadrupolo entre las varillas, y solo los iones de un determinado m/z alcanzarán el detector para una determinada proporción de voltajes y radiofrecuencias: los demás tendrán trayectorias inestables y chocarán con las barras. Esto permite la selección de un ion con una relación m/z particular o permite escanear un rango de valores de m/z variando continuamente el voltaje aplicado.

Analizador de cuadrupolo-tiempo de vuelo (Q-TOF-MS)

Es un tipo de espectrometría de masas híbrido, donde se mide la relación m/z de los iones de una muestra mientras que estos se mantienen en una órbita estable por un campo eléctrico generado por el Q. Así, los iones de la muestra se aceleran en el TOF a una misma energía cinética conocida y se mide el tiempo necesario para que cada ion alcance el detector a una distancia también conocida. La ventaja de la hibridación del Q con el TOF resulta en la posibilidad de poder realizar experimentos de espectrometría en tándem, donde los iones son seleccionados por un Q y son fragmentados en otro Q, para que finalmente la relación m/z de los fragmentos sean analizados por el TOF con una alta exactitud y resolución de masa.

-Detector

El elemento final del espectrómetro de masas es el detector. El detector registra la carga inducida o la corriente producida cuando un ion pasa cerca o impacta en una superficie. Normalmente se utiliza un multiplicador de electrones o electromultiplicador, aunque también se han empleado otros detectores como la copa de Faraday. El funcionamiento del electromultiplicador se basa en el efecto cascada producido al impactar en él un determinado ion o iones. Aplicando una diferencia de potencial entre sus extremos, se consigue aumentar el factor de amplificación, que vendrá determinado por el número de subetapas amplificadoras que componen el detector.

Por tanto, la LC-MS es una técnica que combina las capacidades de separación física de la LC con las capacidades de análisis de MS que permiten obtener información de la masa molecular del compuesto analizado, así como obtener información estructural del mismo. Las capacidades individuales de cada técnica se mejoran de forma sinérgica, mientras que la cromatografía de líquidos separa las mezclas con múltiples componentes, la espectrometría de masas proporciona una identidad estructural de los componentes individuales con alta especificidad molecular y sensibilidad de detección (Figura 6).

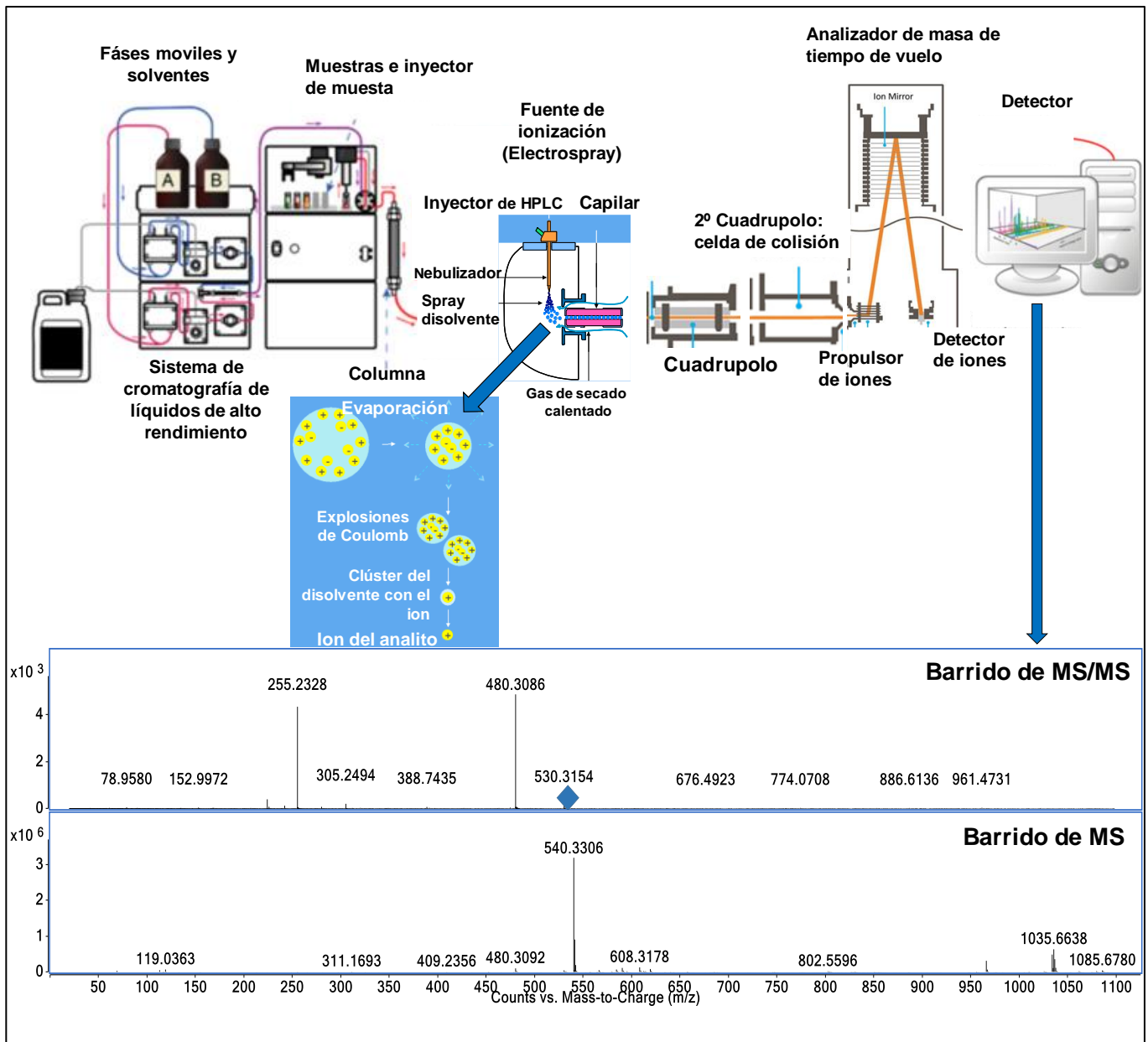


Figura 6: Esquema de los distintos componentes del sistema de LC-MS utilizado, donde se puede apreciar la ionización de los iones por ESI.

Espectrometría de masas en tándem o MS/MS

La espectrometría de masas en tándem (MS/MS) es una técnica que implica múltiples etapas de selección por MS, con alguna fragmentación que ocurre entre las etapas. En

un espectrómetro de masas en tándem, los iones se forman en la fuente de ionización y se separan por su relación m/z en la primera etapa. Se seleccionan iones de una relación de masa carga particular (iones precursores) y se crean iones de fragmentos (iones producto). Esta fragmentación puede realizarse por varios métodos, algunos son disociación inducida por colisión, reacción de ion-molécula, o por fotodisociación. En este trabajo el mecanismo que se ha utilizado fue disociación inducida por colisión. Así, los iones resultantes de la fragmentación se analizan y se detectan en una segunda etapa.

Para un experimento de MS/MS dirigido es imprescindible describir los siguientes parámetros:

-rango de m/z : es el intervalo para el cuál se detectan las masas en él contenidas. Hay rango de m/z para el modo scan, que se utiliza el mismo rango que en el análisis habitual (se suele fijar de 50 a 1000 m/z normalmente) y otro rango para el modo ms/ms, que se suele fijar de 20 a 1000 m/z normalmente ya que se baja el rango para ver las masas de los fragmentos que son más pequeñas que las de las propias moléculas.

-ventana de error de m/z , el intervalo de error permitido para una m/z seleccionada, en el instrumento utilizado en el desarrollo de esta tesis se fijó la ventana más pequeña que puede tener un Q que es de 1.3 Da de error.

- m/z del compuesto a fragmentar, es el m/z del compuesto de interés que se quiere fragmentar para su identificación.

-tiempo de retención del compuesto a fragmentar.

-la ventana del tiempo de retención, es el intervalo de tiempo dentro del cual se busca el m/z seleccionado.

-la carga del compuesto, que es el número de cargas que presenta el compuesto.

-la energía de colisión, que se puede establecer de diferentes modos. Esta energía se suele establecer normalmente en 10 o 20 electronvoltios (eV) para compuestos que tienen hasta 300 o 400 Da de masa y 30 o 40 eV para los que están por encima de 400 Da de masa⁴⁰. Otra consideración a tener en cuenta es que los compuestos cíclicos requieren más energía para fragmentarse que las cadenas lineales. Así pues, se suelen

usar 20 eV y 40 eV, según la energía que requiera cada compuesto, en caso de no saber de qué compuesto se trata se establece una energía de colisión de 10 o 20 eV y después si se observa en el espectro de MS/MS que el compuesto no se ha fragmentado se sube la energía de colisión, estas son las energías de colisión más utilizadas experimentalmente para fragmentar en las bases de datos, como Metlin (0, 10, 20, 40 eV). Por tanto, los espectros de los compuestos que vamos a poder encontrar más fácilmente en las bases de datos de referencia para su posterior identificación es usando las mencionadas energías de colisión. Otra manera de determinar la energía de colisión es por interpolación lineal, esta se hace de forma automática en el método y el equipo calcula la energía de fragmentación para cada uno de los compuestos, esta energía se calcula de acuerdo con la ecuación:

Energía de colisión = (pendiente x m/z del ion precursor) / 100.0 + factor de corrección.

También es importante tener en cuenta que en ocasiones podemos estar ante un espectro de MS/MS que no pertenece solo a un compuesto, sino a dos o varios, que estén próximos en tiempo de retención y similar a la masa del compuesto deseado, se dice entonces que el espectro está contaminado, lo que complica su identificación.

Otro aspecto a tener en cuenta es el de compuestos que se cargan en ambas polaridades, donde realizar el análisis de MS/MS en ambas polaridades es importante porque se puede obtener información complementaria, tal es el caso de los fosfolípidos, los cuales en cada modo de ionización revelan ciertos fragmentos que muestran la identidad del compuesto. En la figura 7 tenemos un ejemplo de los espectros de MS/MS de un fosfolípido donde se observa que el modo positivo revela la clase bioquímica a la que pertenece este compuesto, mientras que el modo negativo, la cadena de ácidos grasos, indicando la longitud de este.

Una vez que hemos obtenido los espectros de fragmentación de MS/MS de los compuestos estadísticamente significativos, el siguiente paso es realizar su identificación por MS/MS, mediante la cual vamos a confirmar la identificación tentativa o asignar una identidad a los compuestos en función de sus patrones de fragmentación.

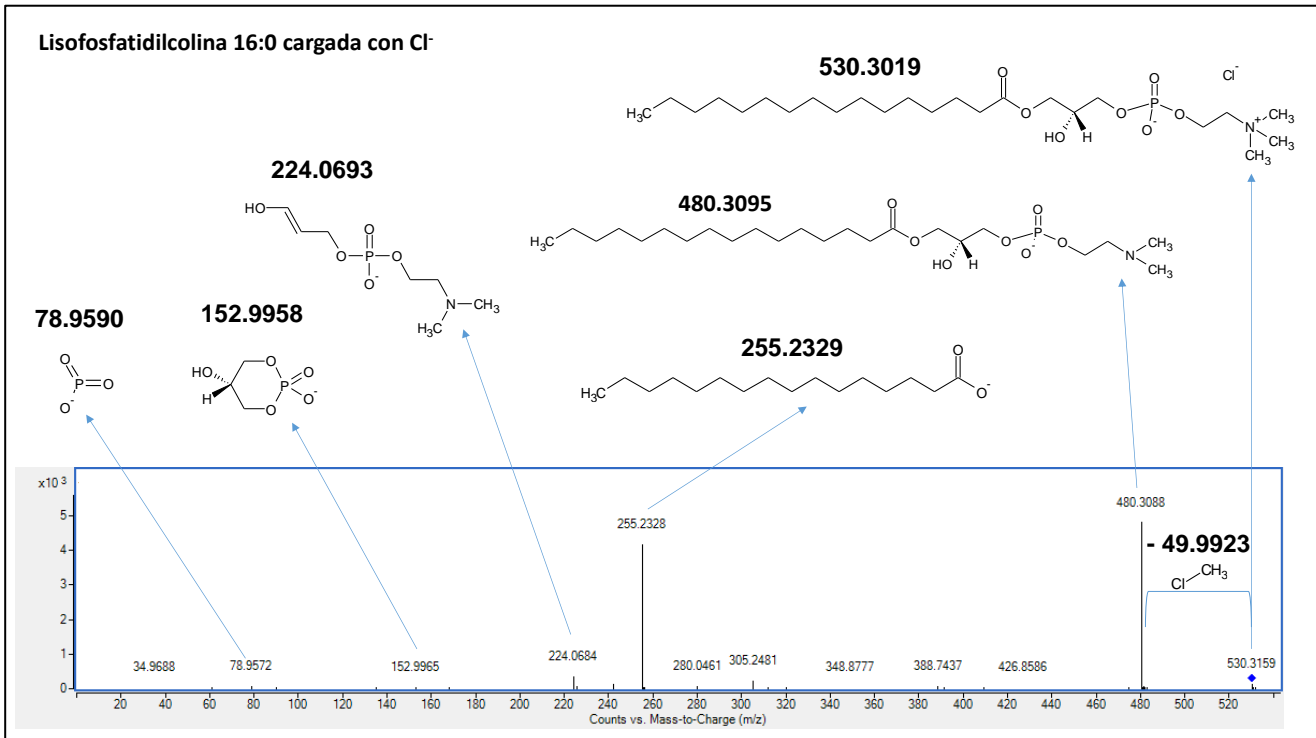
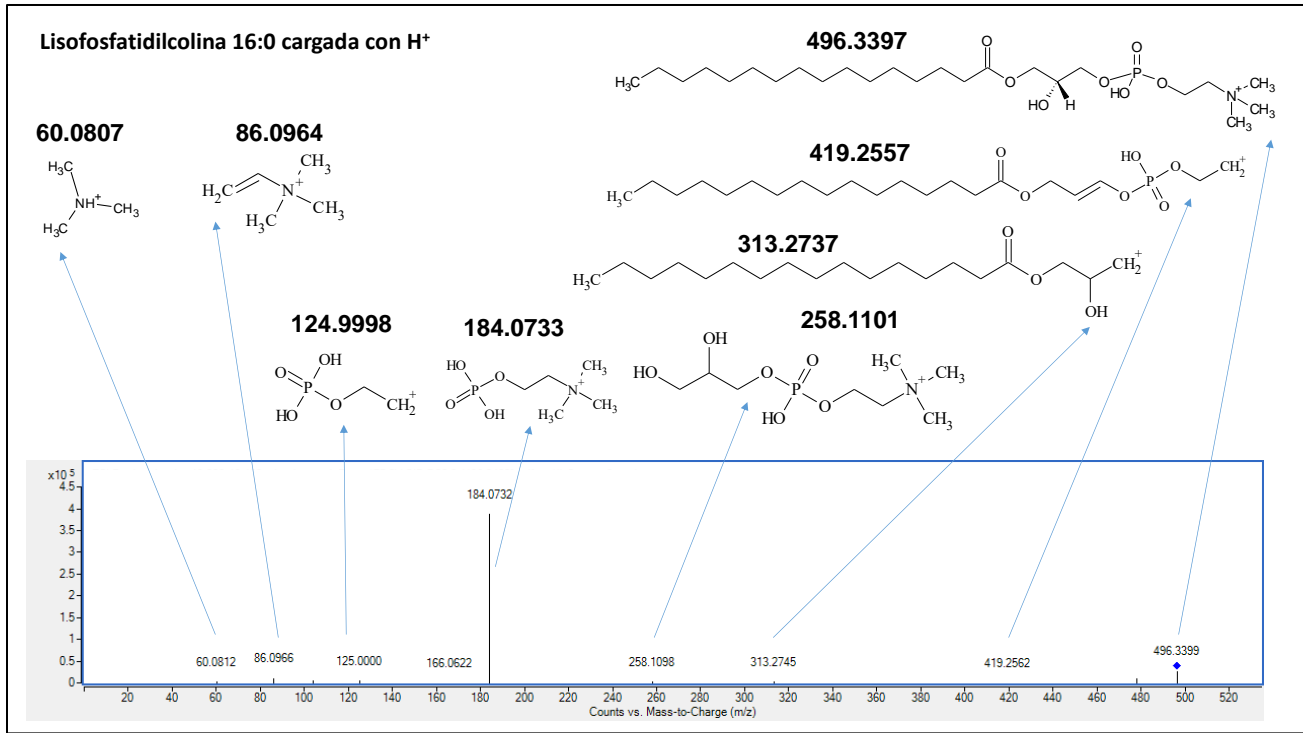


Figura 7. Espectro de MSMS de la lisofosfatidilcolina 16:0 en LC-MS+ (arriba) y LC-MS- (abajo).

Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)

La cromatografía de gases (GC) es una técnica en la que la muestra se volatiliza y se inyecta en el interior de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de gas inerte cuya única función es la de transportar el analito a través de la columna.

Existen dos tipos de cromatografía de gases: la cromatografía gas-sólido y la cromatografía gas-líquido, siendo esta última la que se utiliza más ampliamente. En la cromatografía gas-sólido, la fase estacionaria es sólida y la retención de los analitos en ella se produce mediante el proceso de adsorción. Se utilizan como fase móvil especies gaseosas de bajo peso molecular como helio, nitrógeno o argón dependiendo del detector empleado y como fase estacionaria moléculas de líquido inmovilizadas sobre la superficie de un sólido inerte. En la cromatografía gas-líquido los componentes de una muestra que se vaporiza son fraccionados como consecuencia de ser repartidos entre una fase gaseosa móvil y una fase estacionaria líquida mantenidas en una columna.

La GC se lleva a cabo en un cromatógrafo de gases (Figura 8). Éste consta de diversos componentes como el gas portador, el sistema de inyección de la muestra, la columna cromatográfica (en el interior de un horno para controlar la temperatura), y el detector, el que se ha utilizado en la realización de esta tesis se puede observar en la figura 8.

En la GC las moléculas son retenidas por la columna eluyendo de esta en diferentes momentos (tiempos de retención), en función de sus diferentes puntos de ebullición, lo que permite que el MS capture, ionice, acelere, desvíe y detecte las moléculas ionizadas por separado. El MS acoplado a la GC, consta de los mismos 3 componentes que anteriormente se han descrito para LC-MS, con la diferencia de que en esta técnica los compuestos ya están en forma gaseosa, por lo que los componentes pueden tener características diferentes:

-Fuente de ionización: una de las formas más común es la ionización por impacto electrónico (EI), la cual se utilizó y se detalla su funcionamiento a continuación. Sin embargo, existen otras formas de ionización como la ionización química.

Ionización por impacto electrónico

En la ionización por impacto electrónico, las moléculas entran en el MS donde son bombardeadas con electrones libres emitidos desde un filamento, no muy diferente del filamento que se encuentra en una bombilla estándar. Los electrones bombardean las moléculas, haciendo que la molécula se fragmente de una manera característica y reproducible. El patrón de fragmentación molecular depende de la energía electrónica aplicada al sistema, típicamente 70 eV. El uso de 70 eV facilita la comparación de los espectros generados con los de las espectrotescas, ya sean comerciales por ejemplo el Instituto Nacional de Estándares (NIST-USA) o del fabricante del equipo. Las fuentes de las bibliotecas incluyen NIST, Wiley, AAFS (American Academy of Forensic Sciences), y fabricantes de instrumentos.

-Analizador de masa: Puede ser un Q, una trampa de iones o un Q-TOF, pero el más comúnmente utilizado es el Q, ya que es barato y muy robusto y reproducible, con lo que permite la comparación de los espectros entre distintos laboratorios. Los Q tienen una baja resolución de masa de hasta un decimal, sin embargo, al ser la fragmentación y el analizador muy reproducibles es posible determinar la identidad del compuesto.

Estos dos componentes acoplados –GC-MS–, permiten un mayor grado de identificación de sustancias que cualquiera de las unidades utilizadas individualmente. Una vez separadas las sustancias, son fragmentadas y analizadas en función de su patrón de fragmentación, el cual puede ser comparado con información contenida en una base de datos de espectros de masas para su identificación preliminar.

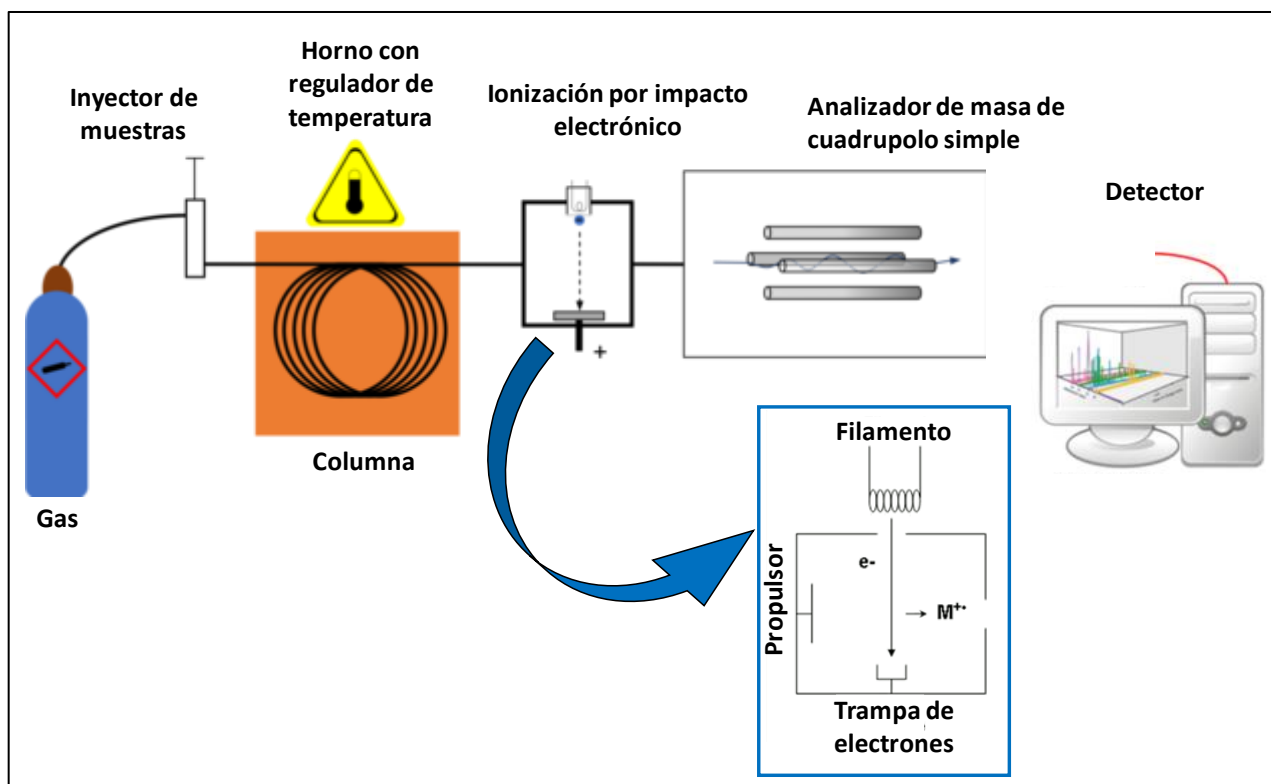


Figura 8: Esquema de los distintos componentes del sistema de GC-MS utilizado.

Pretratamiento de datos y análisis estadístico

Una vez analizadas las muestras mediante las técnicas antes descritas, el siguiente paso es el tratamiento de los datos y su posterior análisis estadístico para seleccionar los metabolitos estadísticamente significativos entre nuestros grupos de estudio.

Los datos recopilados se limpian de ruidos de fondo y de iones no relacionados utilizando el software Profinder, que permite la reducción del tamaño de los datos adquiridos y su complejidad. Esto se consigue a través de la selección de las entidades asociadas con los datos con la aplicación del algoritmo de extracción de entidades moleculares (MFE). Las entidades se alinearon en todas las muestras seleccionados utilizando masa y tiempo de retención (masa@RT). Además, después de MFE, se aplicó el algoritmo de búsqueda de iones, del inglés "Find by Ion (Fbi)". Este algoritmo primero realiza otra vez

el primer algoritmo (de MFE) y luego usa los resultados de este para realizar una búsqueda del ion molecular. Fbi usa la mediana de la masa, la mediana del tiempo de retención y el espectro compuesto de las entidades alineadas para mejorar la confiabilidad en la búsqueda de las características en los datos. Tras la aplicación de estos algoritmos se realizó una serie de filtros que consistían en la eliminación de: compuestos procedentes de la limpieza de la columna cromatográfica y de los blancos, compuestos que no estén presentes en la mayoría de las muestras y finalmente los que tengan un coeficiente de variación (CV%) mayor al 30% en los QC. Tras el tratamiento de los datos se pasó al análisis estadístico tanto multivariante como univariante.

Análisis estadístico multivariante (MVA). Los datos multivariantes constan de los resultados de las observaciones de muchos y diferentes metabolitos (variables) de un número de personas (objetos). Cada variable puede ser considerada como constitutiva de una dimensión diferente, de modo que, si hay “n” variables, cada objeto puede decirse que reside en una posición única, en una entidad abstracta referido como hiperespacio n-dimensional. Este hiperespacio es necesariamente difícil de visualizar y el tema subyacente del MVA es la simplificación o reducción de la dimensionalidad. Esta reducción de dimensionalidad se puede producir de dos maneras: utilizando un algoritmo de enfoque supervisado o bien utilizando otro no supervisado.

Los métodos de pretratamiento de datos en el caso de la estadística multivariante pueden corregir aspectos que dificultan la interpretación biológica de los conjuntos de datos de metabolómica al enfatizar la información biológica en el conjunto de datos y, por lo tanto, mejorar la interpretación biológica. Existen varios escalados y transformaciones que se utilizan en multivariante, pero a continuación solo se detallan los utilizados durante la realización de la tesis.

Escalado de datos: Centrado. Este pretratamiento calcula el valor medio de cada columna de la matriz de datos y resta el valor de la columna, trasladando los ejes del

sistema de coordenadas hacia el centroide de los datos, es decir, hace que cada muestra exhiba solo las diferencias que tienen con respecto a la muestra promedio de los datos originales. De este modo, se compensan las diferencias entre los metabolitos de alta y baja abundancia. Por lo tanto, se utiliza para centrarse solo en la parte fluctuante de los datos.

Transformación logarítmica. La transformación de los datos tiene como objetivo reducir la influencia de los valores atípicos potenciales y transformar la matriz de datos en una distribución de tipo Gaussiana. Se aplica generalmente para corregir heterocedasticidad. La transformación aumenta el peso de los metabolitos de baja intensidad y comprime el extremo superior de la escala de medición.

Métodos no supervisados: En este caso se dispone de un conjunto de observaciones multivariadas, donde no se conocen las clases a las que pertenecen, aquí no existe variable respuesta. La mayoría de los estudios metabolómicos utilizan aplicaciones de Análisis de Componentes Principales (PCA), es una técnica estadística de síntesis de la información o reducción de la dimensión (número de variables). Este método es simple, no paramétrico, que genera información relevante a partir de un conjunto de datos multivariados. Permite explicar la variabilidad existente en los datos de una matriz "Z", de "N" observaciones y "M" variables, por medio de un número menor de variables latentes, combinación lineal de las primeras. Un PCA tiene sentido si existen altas correlaciones entre las variables, ya que esto es indicativo de que existe información redundante y, por tanto, pocas componentes explicaran gran parte de la variabilidad total.

La elección del número de componentes se realiza de tal forma que la primera recoja la mayor proporción posible de la variabilidad original, la segunda componente debe recoger la máxima variabilidad posible no recogida por la primera, y así sucesivamente. Del total de componentes se elegirán aquellos que recojan el porcentaje de variabilidad que se considere suficiente. A estos se les denominará componentes principales. Los

nuevos componentes principales o factores serán una combinación lineal de las variables originales y además serán independientes entre sí.

Una vez seleccionadas las componentes principales, se representan en forma de matriz. Cada elemento de esta representa los coeficientes factoriales de las variables (las correlaciones entre las variables y las componentes principales). La matriz tendrá tantas columnas como componentes principales y tantas filas como variables. Para que una componente sea fácilmente interpretable debe tener como características que los coeficientes factoriales deben ser próximo a 1, una variable debe tener coeficientes elevados solo con un factor y no deben existir factores con coeficientes similares. La capacidad del modelo para la representación de datos reales o bondad de ajuste, esta medida por el valor R^2 y a medida que se complica el modelo agregando variables latentes su valor aumenta (puede llegar a 1 cuando todas las variables latentes se incluyen en el modelo). Sin embargo, en la medida en que el modelo este sobreparametrizado su capacidad de predicción de nuevos datos disminuirá Q^2 .

Q^2 no varía entre 0 y 1 como el caso de R^2 , el indicador de bondad de predicción crece desde 0 hasta un punto máximo donde comienza a decrecer, aunque aumente el número de componentes, lo que indica un sobreajuste del modelo. Un criterio práctico para decidir el número de variables latentes a utilizar sugerido por Wold y cols. establece que si $Q^2 = 0.4$ es aceptable, si $Q^2 > 0.4$ es buena y si $Q^2 > 0.9$ es excelente. Además, la diferencia entre R^2 y Q^2 no debe ser muy grande (entre 0.2 y 0.3).

Métodos supervisados: Un método supervisado es aquel en el que el investigador utiliza el conocimiento previo acerca de la muestra y puede ser utilizado para construir modelos de predicción de clase a la que pertenece una muestra, es decir la variable respuesta está definida. El ajuste por mínimos cuadrados parciales (PLS) sirve para construir modelos de predicción cuando existen múltiples variables y alta relación de estas. PLS puede ser descrito como la extensión de regresión del PCA, a diferencia del PCA en

lugar de describir la variabilidad máxima de los datos, lo que se intenta es encontrar unos pocos factores fundamentales o latentes que explican la mayor parte de la variabilidad en las respuestas, lo cual maximiza la covarianza entre las dos medidas y la variable respuesta.

El análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) es un método de regresión lineal supervisada, basado en la combinación de una matriz de observaciones (datos analíticos) y una matriz de valores. El objetivo del PLS-DA es encontrar variaciones relevantes en la matriz de observaciones que presenten un máximo de covarianza con el vector de información. PLS-DA proporciona un método gráfico de fácil comprensión para identificar las regiones de datos que marcan una separación entre clases, mostrando la bondad de la separación y la significatividad estadística del resultado.

El análisis discriminante ortogonal por mínimos cuadrados parciales (OPLS) se trata de una modificación del método PLS basado en la separación sistemática de los datos metabolómicos en dos componentes: una ortogonal y otra linealmente relacionada al vector de clases. Esta separación facilita la interpretación del modelo, ya que la variación entre clases se puede inferir a partir de la componente predictiva y la variación dentro de las clases se puede deducir de los componentes ortogonales. Un gráfico de OPLS-DA cros-validado es la representación gráfica que coloca a cada muestra en un espacio dentro del modelo según su predicción por el mismo.

Análisis estadístico univariante. Complementaria a la estadística multivariante, donde cada una de las variables es sometida a una prueba clásica de constatación de las medias de dos poblaciones independientes.

Confirmación de la identidad de los metabolitos significativos por experimentos de MS/MS

En el caso particular de la LC-MS, los metabolitos estadísticamente significativos son identificados mediante las bases de datos mencionadas y posteriormente se procede a una verificación de la identificación mediante los experimentos de MS/MS mencionados anteriormente.

Interpretación biológica

La realización de la interpretación biológica no es una tarea sencilla, sin embargo, existen herramientas online en las cuales se introducen los metabolitos significativos y se realiza una búsqueda de las rutas metabólicas que podrían estar implicadas. Algunas de estas herramientas son metaboanalyst⁴¹ KEGG, Reactome o iPath⁴².

Pero en la mayoría de las ocasiones estas herramientas no son suficiente, y se necesita recurrir a la literatura publicada para poder entender los cambios que se están detectando en los individuos, comparando los resultados, por ejemplo, con otros estudios o trabajos realizados en las mismas patologías y en las mismas condiciones, o por medio de la búsqueda de la relación de los metabolitos con la patología.

Además, no hay que olvidar que siempre se trata de relacionar la discusión de los resultados y la interpretación biológica con la clínica, de modo que se puedan reflejar estos cambios metabólicos con otros cambios visibles, medibles o interpretables por los médicos.

Otras ómicas: Proteómica

Las proteínas son grandes biomoléculas constituidas por una secuencia de aminoácidos que realizan una amplia gama de funciones dentro de los organismos y el proteoma es el conjunto completo de proteínas que es producido o modificado por un organismo o

sistema. Por tanto, la proteómica es la caracterización del proteoma, que incluye expresión, estructura, funciones, interacciones y modificaciones de proteínas en cualquier etapa. El proteoma también fluctúa de vez en cuando, de célula a célula y en respuesta a estímulos externos, y por supuesto es complementaria a las demás ómicas⁴³⁻⁴⁵.

Hay muchas técnicas utilizadas en proteómica, aquí mencionamos las más utilizadas⁴⁶ :

1. Cuantificación de proteínas. Se utilizan técnicas como el marcaje por afinidad codificada por isótopos (ICAT), marcaje con isótopos estables con aminoácidos en cultivo celular (SILAC), marcaje con masas en tándem (TMT) y marcaje isobárico para cuantificación relativa y absoluta (iTRAQ). Cuando es posible calcular la cantidad de proteínas en una muestra, se llama proteómica cuantitativa.

2. Análisis estructural. La cristalografía de rayos X y la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) son dos técnicas principales de alto rendimiento que proporcionan una estructura tridimensional (3D) de proteína que podría ser útil para estudiar su función biológica.

3. Purificación de proteínas. Las técnicas convencionales para la purificación de proteínas se basan en la cromatografía, como la cromatografía de intercambio iónico (IEC), la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) y la cromatografía de afinidad. La purificación consiste en separar una proteína de una mezcla compleja, primero uniendo la muestra a una columna cromatográfica, después lavando para eliminar las sustancias que no se unen y por último eluyendo la proteína de interés que se une con las partículas de la columna.

4. Análisis de proteínas. Para el análisis de proteínas selectivas, se puede utilizar el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y la transferencia por Western. Esta técnica permite observar las diferentes propiedades de una proteína estudiada.

5. Caracterización de proteínas. Para caracterizar la composición proteica de una muestra, las técnicas utilizadas son la electroforesis en gel de poliacrilamida y dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), la electroforesis en gel bidimensional (2-DE) y la electroforesis en gel diferencial bidimensional (2D-DIGE). Primero, se realiza la

separación de muestras de proteínas complejas y luego se acoplan a diversas técnicas como MS para analizar las mezclas de proteínas complejas con mayor sensibilidad.

6. Análisis de secuencia de proteínas. Es el estudio de la secuencia de aminoácidos que forma una proteína, un ejemplo es la degradación de Edman.

Después de explicar las técnicas más utilizadas en proteómica, ahora es el momento de pasar por las aplicaciones de proteómica.

1. Perfiles de expresión de proteínas. Esta área estudia, por ejemplo, la microbiología médica, el mecanismo de transducción de señales o el mecanismo subyacente en una enfermedad.

2. Proteómica estructural. Esta aplicación estudia con más detalle a nivel de biología celular, las proteínas, como la composición de orgánulos, el aislamiento de subproteomas o los complejos de proteínas.

3. Modificaciones postraduccionales. Estudia las posibles modificaciones que pueden tener lugar en una proteína después de su síntesis, como la glicosilación, la fosforilación o la hidroxilación entre otros.

4. Interacciones proteína-proteína. Esta aplicación trata sobre cómo las proteínas interactúan entre sí, mecanismos, enlaces, conformación, etc.

5. Proteómica funcional. Se trata del estudio que determina qué función o funciones desarrolla una proteína en particular, y puede realizarse mediante complejos proteicos purificados por afinidad o utilizando nocaouts de ratón, por ejemplo.

6. Estudio de datos del proteoma. Es el área que estudia el descubrimiento de nuevos fármacos, aislamiento y estudio de enzimas que controlan procesos clave y como nuevos fármacos afectan a estas enzimas y a los procesos que regulan.

Hipótesis

Por todo lo anterior mencionado, la hipótesis de este trabajo es que existe un perfil metabólico característico, es decir, una alteración en un conjunto de metabolitos que pueden caracterizar al grupo de pacientes graves alérgicos a gramíneas con alergia alimentaria que se diferencian del resto de pacientes alérgicos (leves-moderados) y los no alérgicos. Pensamos que estos cambios metabólicos pueden posiblemente definir el estado inflamatorio y permiten entender la progresión de la enfermedad en un paciente alérgico.

Objetivos

Utilizando plasma de pacientes muy bien fenotipados con una alergia respiratoria ligada a alimentaria, se plantean los siguientes objetivos para la tesis:

1-Obtención del perfil metabólico de las muestras de plasma mediante la combinación de dos herramientas analíticas y complementarias como son la LC-MS y la GC-MS.

2-Análisis de los perfiles metabólicos obtenidos mediante las técnicas analíticas mencionadas utilizando herramientas de estadística tanto univariante como multivariantes.

3-Realizar la interpretación biológica de los resultados para estudiar las rutas metabólicas afectadas en esta patología y los principales metabolitos implicados de cada una de ellas.

4-Discusión de los resultados encontrados con objeto de la búsqueda de posibles biomarcadores relacionados con la inflamación alérgica y con la progresión de la enfermedad.

5-Establecer y aplicar una metodología mediante proteómica que permita en una sola muestra, la medición de los cambios en la distribución relativa de los diferentes isotipos de anticuerpos específicos de un alérgeno en suero durante un periodo de tiempo utilizando espectrometría de masas cuantitativa.

Materiales y Métodos

Pacientes del estudio y criterios utilizados

Veinticinco individuos (de 18 a 55 años) se reclutaron para el estudio. Todos los sujetos proporcionaron un consentimiento informado por escrito y el protocolo fue aprobado por los comités de investigación y ética de los hospitales participantes.

Estos pacientes han sido estudiados en profundidad para la remodelación de la mucosa oral en un estudio previo³⁴. Seis de los sujetos no eran alérgicos y se utilizaron como controles. Todos los pacientes fueron entrevistados para establecer su historia clínica. Los criterios de inclusión para los pacientes alérgicos fueron los siguientes: una prueba cutánea positiva para profilina, pero negativa para proteínas de transferencia de lípidos utilizando extractos comerciales, IgE específica positiva para profilina (> 0.35 kU/l), pero negativa para Pru p 3 y Bet v 1 (ImmunoCAP e ISAC CAP, Thermo Fisher Scientific, Uppsala, Suecia). Los pacientes se sometieron a una prueba de provocación oral utilizando un extracto de profilina puro. El estado clínico se determinó en base a la historia clínica y al resultado de la provocación oral. Los pacientes que sufrieron reacciones sistémicas que afectaban a varios órganos (piel, vía aérea, sistema gastrointestinal...), fueron clasificados como "pacientes con alergia grave a la profilina" ($n = 6$). Los pacientes que presentaron reacciones únicamente locales o subjetivas durante la provocación, como el síndrome de alergia oral (SAO), el angioedema o el prurito oral, se consideraron como "pacientes sin alergia grave a profilina" ($n = 12$). Los datos individuales se incluyen en la Tabla 3.

Paciente	Edad/Sexo	Alergias alimentarias reportadas	Reacciones alérgicas reportadas	Reacciones a la prueba de provocación	Medicación de rescate*	Estado clínico*
P.1	36/F	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	No alérgico
P.2	34/M	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	No alérgico
P.3	29/F	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	No alérgico
P.4	35/F	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	No alérgico
P.5	27/F	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	No alérgico
P.6	38/F	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	No alérgico
P.7	47/F	P, T	SAO, EM	Ninguna	Ninguna	Paciente no grave alérgico a profilina
P.8	19/F	M, Pr, F	SAO	SAO	Ninguna	Paciente no grave alérgico a profilina
P.9	41/F	Me, Pr, Al, Ce, K, P, Ag, Pi, Ma, Ca, M, S	SAO, RESP	RESP	Salbutamol	Paciente no grave alérgico a profilina
P.10	53/M	Ninguna	Ninguna	PO (2/10)	Ninguna	Paciente no grave alérgico a profilina
P.11	29/M	Ninguna	Ninguna	PO	Cetirizina	Paciente no grave alérgico a profilina
P.12	34/F	F, M	ERI	SAO	Ninguna	Paciente no grave alérgico a profilina
P.13	37/M	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Paciente no grave alérgico a profilina
P.14	44/F	Me, Ca, F, Mm, K, P, Ag, Pi, An, Na, H, Nu, B, T, Pe, M	SAO	PO (8/10)	Ninguna	Paciente no grave alérgico a profilina
P.15	44/F	L	BE, DG, HT, NA, RI, UR, EM	DSF, SAO	Antihistamínicos IV y corticoides	Paciente no grave alérgico a profilina
P.16	28/F	M, S, Ce	SAO, DF	AF, SAO	Ninguna	Paciente no grave alérgico a profilina
P.17	38/M	K, Li, Ma, M, Pi, F	SAO	PO, T, DSF	Cetirizina	Paciente no grave alérgico a profilina
P.18	25/F	M, S	DA, SAO, DF, DSF, DG, EU, GF, NA, EM	SAO, DSF, AL, NA	Antihistamínicos IV, Corticoides, Adrenalina IM	Paciente grave alérgico a profilina
P.19	44/F	M	SAO, ERI, T, GF, DG	AL, SAO, DSF, NA	Adrenalina IM, antihistamina IV	Paciente grave alérgico a profilina
P.20*	26/F	L, M, T	BE, EU	No llevada a cabo		Paciente grave alérgico a profilina
P.21	31/F	M, S	SAO	AL	Ninguna	Paciente no grave alérgico a profilina

P.22	26/M	M, S, P	SAO, AL	Ninguna	Ninguna	Paciente no grave alérgico a profilina
P.23	20/F	Ma, T	SAO	EU, DSF	Adrenalina IM, Actocortina IV, Dexclorfeniramina maleato	Paciente grave alérgico a profilina
P.24	22/M	M, F	BE, SAO	BE, EU, DSF	Adrenalina IM, Actocortina IV, Dexclorfeniramina maleato	Paciente grave alérgico a profilina
P.25*	41/F	M	BE, EU, UR	No llevada a cabo		Paciente grave alérgico a profilina

Alimentos: **M**, Manzana; **Al**, Albaricoque; **B**, Berejena; **Ag**, aguacate; **P**, Plátano; **Ce**, Cereza; **An**, Anacardo; **Pe**, Pepino; **H**, Higo; **K**, Kiwi; **L**, Lechuga; **Li**, Limón; **M**, Melón; **Ma**, Mandarina; **Na**, Naranja; **Me**, Melocotón; **Pr**, Pera; **Pi**, Piña; **Ca**, Cacahuete; **Mm**, membrillo; **F**, Fresa; **T**, Tomate; **S**, Sandía; **Nu**, Nuez.

Reacciones: **DA**, Dolor abdominal; **BE**, Broncoespasmo; **DSF**, Disfagia; **DF**, Disfonía; **DG**, Dolor epigástrico; **ERI**, Eritema; **EU**, Edema de úvula; **HT**, Hipotensión; **AL**, Angioedema labial; **NA**, Náuseas; **SAO**, Síndrome de alergia oral; **PO**, Prurito Oral; **GF**, Globo Faríngeo; **RESP**, Síntomas respiratorios; **RI**, Rinitis; **UR**, Urticaria; **EM**, Emesis; **T**, Tos; **AF**, Aftas.

Nota: Los pacientes graves alérgicos a profilina sufrieron reacciones sistémicas durante el test de provocación con profilina.

&: Medicación utilizada para controlar las reacciones durante el test de provocación con profilina.

*****: El test de provocación con profilina no se llevó a cabo debido a la gravedad de las reacciones reportadas por los pacientes.

Tabla 3. información de los pacientes.

Se excluyeron del estudio aquellos pacientes alérgicos que habían recibido algún tratamiento con inmunoterapia con extracto de polen en los últimos 5 años o que presentaban asma no controlado.

Obtención de muestras y técnicas utilizadas

Las muestras de sangre de cada uno de los individuos se obtuvieron antes de la provocación oral con profilina. La sangre se procesó para obtener el plasma utilizando un Ficoll-Paque (GE Healthcare™) por centrifugación en gradiente de densidad. Una vez obtenidas las muestras de plasma, se congelaron a -80 °C hasta el día de su análisis. Las muestras de plasma se midieron utilizando dos técnicas complementarias como son LC-MS y GC-MS.

Descripción detallada de los análisis metabolómicos

LC-MS

Tratamiento de la muestra

La precipitación de proteínas y la extracción de metabolitos se realizó agregando 1 volumen de plasma a 3 volúmenes de mezcla fría (-20 °C) de metanol y etanol (1: 1). Las muestras se mezclaron en vórtex y se dejaron reposar en hielo durante 5 minutos. El sedimento se eliminó mediante centrifugación a 16 000 × g durante 20 minutos a 4 °C, y el sobrenadante se transfirió a un vial de LC para su análisis. Las muestras se midieron utilizando un sistema Agilent HPLC (serie 1200), junto con un analizador Q-TOF-MS 6520 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania).

Preparación de muestras de control de calidad y aleatorización

En paralelo a la preparación de las muestras se preparó una muestra de control de calidad (QC). Las muestras de QC se prepararon agrupando volúmenes iguales de plasma de cada una de las muestras del estudio. Los QC siguieron el mismo procedimiento aplicado para las muestras experimentales. En el caso de LC-MS, se utilizó una muestra de QC, mientras que para GC-MS se prepararon independientemente cuatro muestras de QC. Los QC se analizaron durante ambos análisis para proporcionar una medida de la estabilidad del sistema, el rendimiento y la reproducibilidad del procedimiento del tratamiento de muestra. El orden del análisis de todas las muestras que se prepararon se aleatorizó antes de la extracción de metabolitos.

Equipo LC-QTOF-MS

El análisis se llevó a cabo como ha sido descrito anteriormente⁴⁷. Se inyectaron 10 µl de muestra en una columna Discovery HS C18 (2.1 mm x 150 mm, 3.0 µm; Supelco, Sigma Aldrich, Alemania), con una pre-columna Discovery® HS C18 (2 cm x 2.1 mm, 3 µm; Supelco, Sigma Aldrich, Alemania), ambos manteniendo la temperatura (40 ° C). El flujo se fijó en 0,6 ml/min. El gradiente de elución involucró una fase móvil que consiste en (A) 0.1% de ácido fórmico (FA) en agua y (B) 0.1% de FA en ACN. La condición inicial se estableció en un 25% de B, aumentando a un 95% de B en 35 minutos, seguido de un reequilibrio durante 1 minuto y finalmente se mantuvo durante 9 minutos en condiciones iniciales. La velocidad de flujo se estableció en 0,6 ml/min, y se inyectaron 10 µl de muestra. Los datos de la fuente de ionización por ESI se adquirieron en modo de ion positivo y negativo, respectivamente. El voltaje capilar se estableció en 3,500 para ESI (+) y 4,000 V para ESI (-). El caudal del gas de secado fue de 10,5 l/min a 330 ° C y el nebulizador de gas a 52 psi; El voltaje del fragmentador fue de 175 V; el skimmer y el voltaje de radiofrecuencia del Q se ajustaron a 65 y 750 V, respectivamente. Los datos se recolectaron en el modo centroide a una velocidad de barrido de 1.2 espectros por segundo. La detección por MS se realizó en un escaneo completo de 100 a 1200 m/z para ambos modos. Los iones de referencia fueron la purina ($m/z = 121.0508$) y HP-0921 ($m/z = 922.0097$) para ESI (+), mientras que TFA NH₄ ($m/z = 119.0363$) y HP-0921 ($m/z = 966.0007$) para ESI (-). Estos iones se analizaron continuamente en el sistema para permitir la corrección constante de la masa. Las muestras se analizaron en series separadas para cada modo de ionización.

Pretratamiento de datos

Los datos adquiridos se procesaron para obtener los datos estructurados y en un formato apropiado para el análisis de datos utilizando el software MassHunter Profinder (B.06.00, Agilent Technologies).

Los parámetros establecidos para cada modo de análisis se encuentran resumidos en la Tabla 4.

	Modo Positivo	Modo Negativo
	MFE (Extracción de la entidad química molecular)	
1	Altura Mínima > = 1000 cuentas	Altura Mínima > = 500 cuentas
2	Especies de iones: H ⁺ , Na ⁺ , K ⁺ y pérdida de masa neutra H ₂ O	Especies de iones: H ⁺ , H ⁻ , Cl ⁻ , COO ⁻ y pérdida de masa neutra H ₂ O
3	Modelo Isotópico: moléculas orgánicas comunes (No Halógenos)	Modelo Isotópico: moléculas orgánicas comunes
4	Límite asignado de carga máxima: 2	Límite asignado de carga máxima: 2
5	Mínimo Dos o más iones para el perfil isotópico	Mínimo Dos o más iones para el perfil isotópico
6	Ventana de Tiempo de retención: 1 % + 0.5 min	Ventana de Tiempo de retención: 1% + 0.1 min
7	Ventana de Masa: 20.00 partes por millón + 2 mDa	Ventana de Masa: 20.00 partes por millón + 2 mDa
8	Puntuación del Algoritmo > = 60.00	Puntuación del Algoritmo > = 60.00
9	Presente en al menos 2 muestras en alguno de los grupos	Presente en al menos 2 muestras en alguno de los grupos
	Modo Positivo	Modo Negativo
	FBI (Búsqueda por Ion)	
1	Altura Mínima > = 3700 cuentas	Altura Mínima > = 3000 cuentas
2	Los demás parámetros igual que en MFE	
3	Presente en al menos el 60% de las muestras en al menos uno de los grupos	Presente en al menos el 60% de las muestras en al menos uno de los grupos

Tabla 4. Parámetros utilizados en Profinder (Agilent) para el procesamiento de las muestras.

Tras esto la matriz de datos original fue sometida a un proceso de calidad de los datos.

Identificación tentativa y confirmación de la identidad de los metabolitos por experimentos de MS/MS

Los compuestos significativos ($p < 0.05$) fueron identificados tentativamente utilizando la herramienta de búsqueda “CEU Mass Mediator” (CMM, <http://ceumass.eps.uspceu.es>) que presenta una interfaz, en línea, simple para consultar diferentes bases de datos de metabolómicas, como HMDB “*Human Metabolome Data Base*”, KEGG, Lipidmaps y Metlin (CMM 1.0)⁴⁸.

La identificación final se confirmó mediante experimentos de MS/MS utilizando un Q-TOF (modelo 6520, Agilent). Los experimentos se repitieron en las mismas condiciones cromatográficas idénticas a los análisis primarios. Los iones se seleccionaron utilizando la ventana m/z estrecha (1.3 Da) y 20 eV de energía para la fragmentación en el cuadrupolo a la RT determinada previamente. La comparación de la estructura propuesta con los fragmentos obtenidos condujo a la confirmación de la identidad. Finalmente, para aquellos compuestos con un estándar comercial disponible, estos se confirmaron mediante la comparación del RT y el espectro de fragmentación del estándar.

GC-MS

Tratamiento de muestra

Para la precipitación de proteínas, se agregaron 120 μ l de ACN frío a 40 μ l de cada muestra de plasma en un tubo (Eppendorf, tubos de 1.5 y 2.0 ml, Hamburgo, Alemania). La fracción de metabolitos se aisló después de 5 minutos de que la muestra estuviera reposando en hielo, mediante centrifugación (16,000 \times g, 15 min, 4 °C). Del sobrenadante resultante, se transfirieron 100 μ l a un vial de GC con inserto y luego se evaporaron hasta sequedad durante 2 horas a 35°C (concentrador SpeedVac, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Luego, se agregaron 10 μ l de clorhidrato de O-metoxiamina en piridina (15 mg/ml) a cada vial de GC, y la mezcla se mezcló vigorosamente con vórtex y se ultrasonicó en frío durante 15 minutos. La metoximación se llevó a cabo en

oscuridad, a temperatura ambiente durante 16 h. Posteriormente, se agregaron 10 μL de N, O-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) con 1% de trimetilclorosilano (TMCS) como catalizador adicional y se mezclaron utilizando vórtex. Para el proceso de sililación, las muestras se calentaron en un horno durante 1 hora a 70 °C. Finalmente, se agregaron 100 μl de heptano que contenía 10 ppm de éster metílico C18:0 que es el estándar interno (IS) a cada vial de GC y se mezclaron con vórtex antes de su análisis.

Equipo GC-Q-MS

Los análisis GC-MS se realizaron mediante un sistema GC (Agilent Technologies 7890A) equipado con un inyector automático (Agilent 7693) acoplado a un espectrómetro de masas de Q sencillo con detector de triple eje (5975C, Agilent). Dos microlitros (2 μl) de la muestra derivatizada fueron inyectados a través de una columna GC DB5-MS (30 m de longitud, 0.25 mm id, 0.25 μm de película 95% de dimetilpolifenilpolisiloxano) con una precolumna integrada (10 m J&W, Agilent). El flujo del gas portador (He) se estableció en 1 ml/min y la temperatura del inyector a 250 °C.

La ratio de división de la muestra se estableció de 1:5 a 1:10 con un flujo de 3 a 10 ml/min. La división del flujo se llevó a cabo en el interior de una guía de lana de vidrio desactivada (Restek 20782, Bellefonte, PA, EE. UU). El gradiente de temperatura se programó de la siguiente manera: la temperatura inicial del horno se fijó a 60 °C (mantenida durante 1 min), aumentada a 325 °C a una razón de 10 °C/min (hasta 26.5 min) y se mantuvo a 325 °C durante 10 min. El tiempo total de ejecución fue de 37.5 min. Se aplicó un período de enfriamiento durante 10 minutos antes de la siguiente inyección. La línea de transferencia del detector, la fuente de filamento y la temperatura del Q se ajustaron a 280 °C, 230 °C y 150 °C, respectivamente. La detección de MS se realizó con el modo de ionización de impacto electrónico (EI) a -70 eV. El espectrómetro de masas funcionó en modo de exploración en un rango de m/z de 50-600 a una velocidad de 2,7 exploración/segundo. Al inicio del análisis, se inyectaron varias inyecciones de IS, una mezcla estándar de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME C8-C30), blancos de

extracción y el mismo QC 3 veces seguidas, luego se inyectó un QC cada 5 muestras y al final de la lista de trabajo. Estas condiciones fueron adoptadas de trabajos anteriores⁴⁹.

Tratamiento de datos e identificación de compuestos

Los datos de GC-MS, la detección de picos y los algoritmos de procesamiento de espectros se aplicaron utilizando el software Agilent Mass Hunter (Agilent). El rendimiento analítico general se examinó cuidadosamente mediante la inspección de cromatogramas de iones totales (TIC) de muestras experimentales, muestras de QC, blancos y IS. Los datos sin procesar se convirtieron en un archivo de extensión manejable utilizando el software GC-MS Translator (MassHunter GC-MS Translator B.0705 2479 23-Ago-2016, Agilent). Posteriormente, se empleó la deconvolución espectral de masas automática para identificar compuestos coeluidos de acuerdo con sus índices de retención (RI) y tiempos de retención (RT) utilizando el software de “Unknown analysis” versión B.07.00 de Agilent. Para lograr esto, se utilizaron las RT del análisis de la solución estándar FAME C8-C30 para crear un archivo de datos de calibración para un ajuste adicional de las RT en las muestras. La mejora de la precisión se basó en la determinación del índice de retención (RI) de Kovats. El valor de RI contenido en la biblioteca Fiehn RTL (Tiempo de retención bloqueado) se comparó con el valor de RI experimental para asignar una puntuación de similitud entre los espectros experimental y teórico. Los compuestos que no se lograron asignar con esto, se identificaron comparando sus patrones de fragmentación de masa con la biblioteca NIST v.14 (G1676AA, Agilent) utilizando el software “MassHunter Qualitative” (Agilent). La integración de los objetivos y la alineación de la deriva se realizaron en el “MassHunter Quantitative” (Agilent). El filtrado de datos sin procesar se realizó eliminando aquellas señales detectadas en <50% de todas las muestras de QC y con una desviación estándar relativa (% RSD) > 30% en las muestras de QC. La matriz de datos se normalizó utilizando el algoritmo de “median fold change”. Este algoritmo se utiliza para realizar una normalización de la matriz de datos que consiste en generar un vector columna de referencia que contiene las medianas de todas las variables (m medianas), y cada columna (cada perfil de individuo) se divide entre ese vector de referencia.

Posteriormente, en estos nuevos n perfiles obtenidos se calcula la mediana de cada uno de ellos (n medianas) y se divide cada uno de los perfiles originales entre estas medianas obtenidas.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos, previamente se realizó una sustitución de los valores faltantes. Estos datos perdidos se generan por la complejidad del algoritmo MFE y Fbl, y para reemplazarlos se ha utilizado una función matemática llamada kNN o vecinos más cercanos (del inglés, *k-nearest neighbors*, desarrollado por Fix y Hodges en 1951). Este algoritmo permite estimar el valor perdido mediante la similitud del perfil con las muestras cercanas o vecinos del grupo al que pertenecen⁵⁰.

Tras este pretratamiento, los datos de ambas técnicas fueron analizados utilizando estadística multivariante y univariante. Para el análisis multivariante se utilizó el software SIMCA 14.1 (Umetrics) y para el univariante Matlab R2015a (The MathWorks, Inc). Para el MVA, a los datos se les aplicó una transformación logarítmica y un escalado de centrado. Para este estudio se aplicaron dos pruebas no paramétricas ($n < 30$), por un lado, una U-de Mann-Whitney para comparaciones entre dos grupos; y un ANOVA-no paramétrico de un factor para 3 o más grupos llamado prueba de Kruskal-Wallis.

Materiales y métodos: Proteómica

De un ensayo clínico previo en el que se utilizó inmunoterapia subcutánea (SCIT) e inmunoterapia sublingual (SLIT) en pacientes alérgicos⁵¹, se seleccionaron al azar 8 muestras de suero, que consistían en 4 tratamientos con SLIT y 4 con SCIT. En el ensayo, se realizó un seguimiento de los pacientes durante 15 meses y se obtuvieron muestras en 7 puntos del tiempo: 2 meses antes del comienzo del ensayo y 1, 3, 7, 10, 12 y 15 meses después de comenzar el ensayo. La Junta Danesa de Ética aprobó el estudio, y todos los sujetos firmaron consentimientos informados antes de realizar cualquier procedimiento.

Todos los anticuerpos específicos de alérgenos en las muestras de suero se enriquecieron por la unión a alérgenos conjugados con biotina y capturados por perlas magnéticas. Las proteínas se digirieron a péptidos y se marcaron con Tandem Mass Tags (TMT, Thermo). Los péptidos marcados de los diferentes puntos de tiempo (7 muestras) de un paciente se mezclaron en un solo tubo y se analizaron con LC-MS/MS (Q-Exactive, Thermo). El análisis de los datos se realizó utilizando el software Proteome Discoverer (Thermo). El procedimiento completo y detallado se encuentra en el capítulo de proteómica.

Resultados

Perfil metabólico de las muestras y clasificación de pacientes.

Utilizando LC-MS y GC-MS se obtuvieron los perfiles metabólicos de las muestras de plasma, y en cada una de las muestras se pudieron obtener 349 y 400 entidades químicas en LC-MS para modo positivo y negativo, respectivamente, y 95 entidades para GC-MS. La calidad de estos datos se evaluó mediante la agrupación de los QC en un modelo no supervisado utilizando de PCA para las tres matrices de datos (Figura 9).

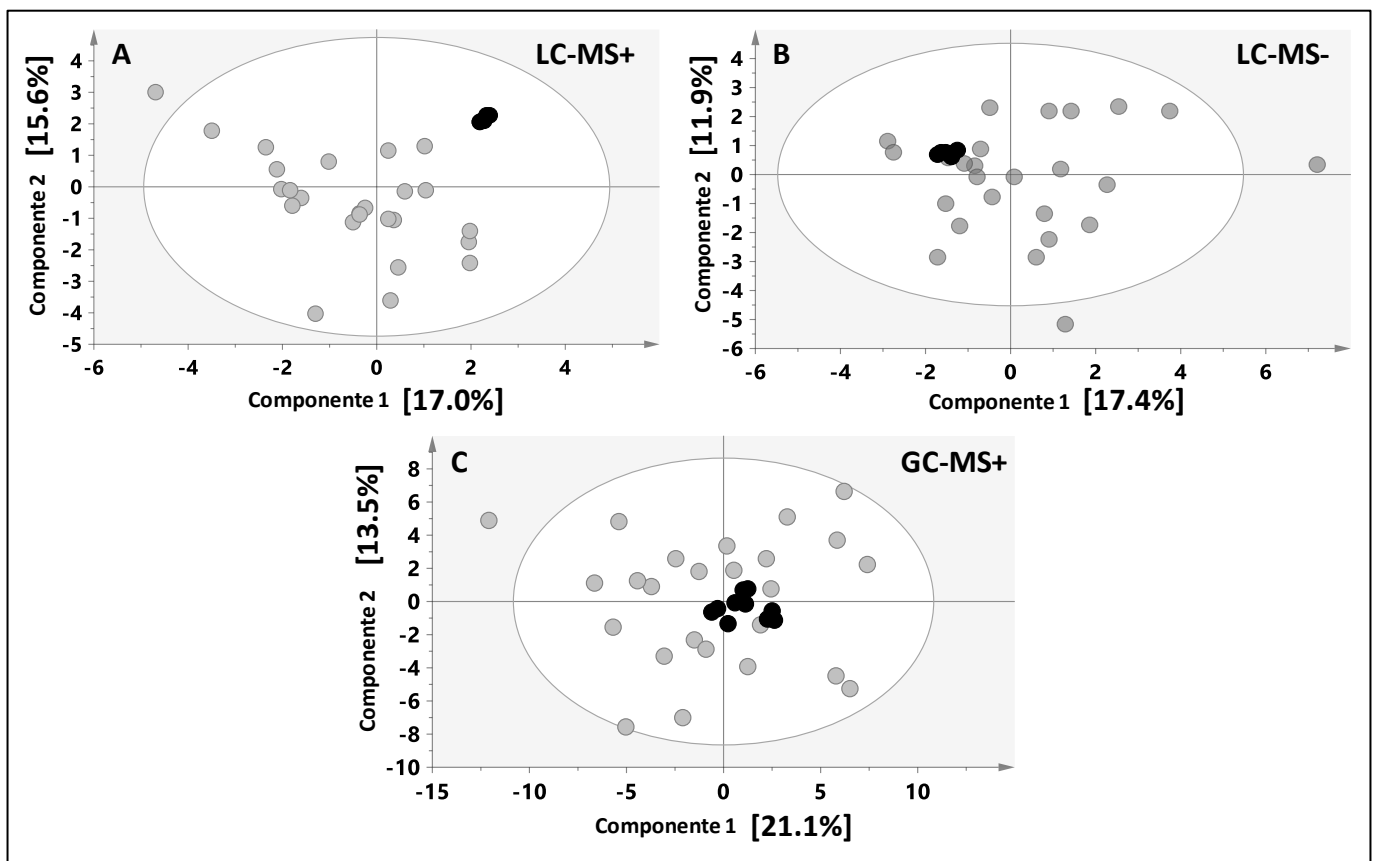


Figura 9. Modelos PCA que muestran la calidad de los datos en las 3 técnicas. Leyenda: controles de calidad (negro), muestras (gris).

A continuación, se examinaron las tendencias de las muestras utilizando un modelo de PCA a partir de los datos de las 3 técnicas, y en los cuales no se observó una agrupación clara de los pacientes según su estado clínico, como se puede apreciar en la figura 10.

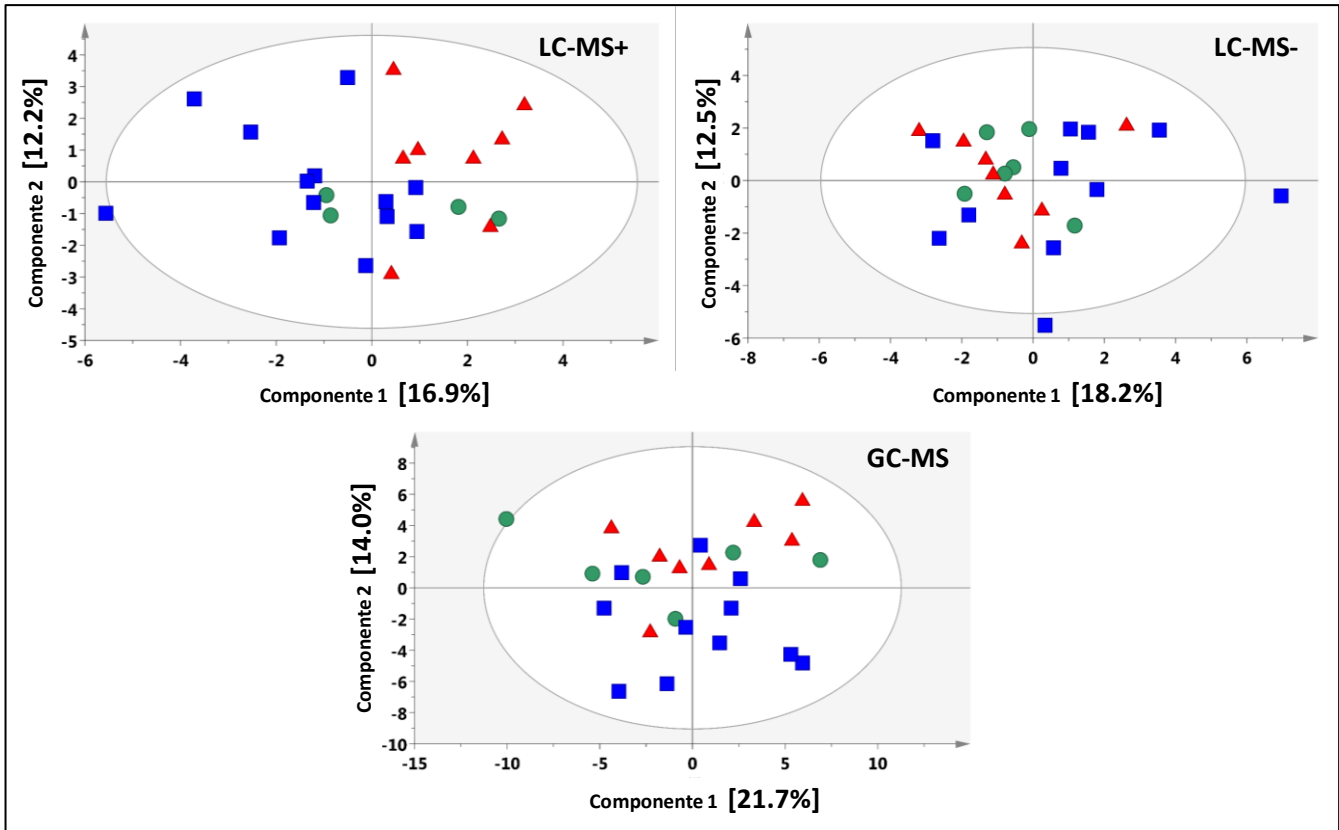


Figura 10. Modelos PCA que muestran la tendencia de las muestras en las 3 técnicas. Leyenda: "No alérgicos" (●; círculo verde), "Pacientes no graves alérgicos a profilina" (■; cuadrado azul), "Pacientes graves alérgicos a profilina" (▲; triángulo rojo).

Por otro lado, los individuos con un estado clínico claro ("no alérgicos" y "pacientes graves alérgicos a profilina") se analizaron utilizando un modelo supervisado de PLS-DA en las tres técnicas. (Figura 11).

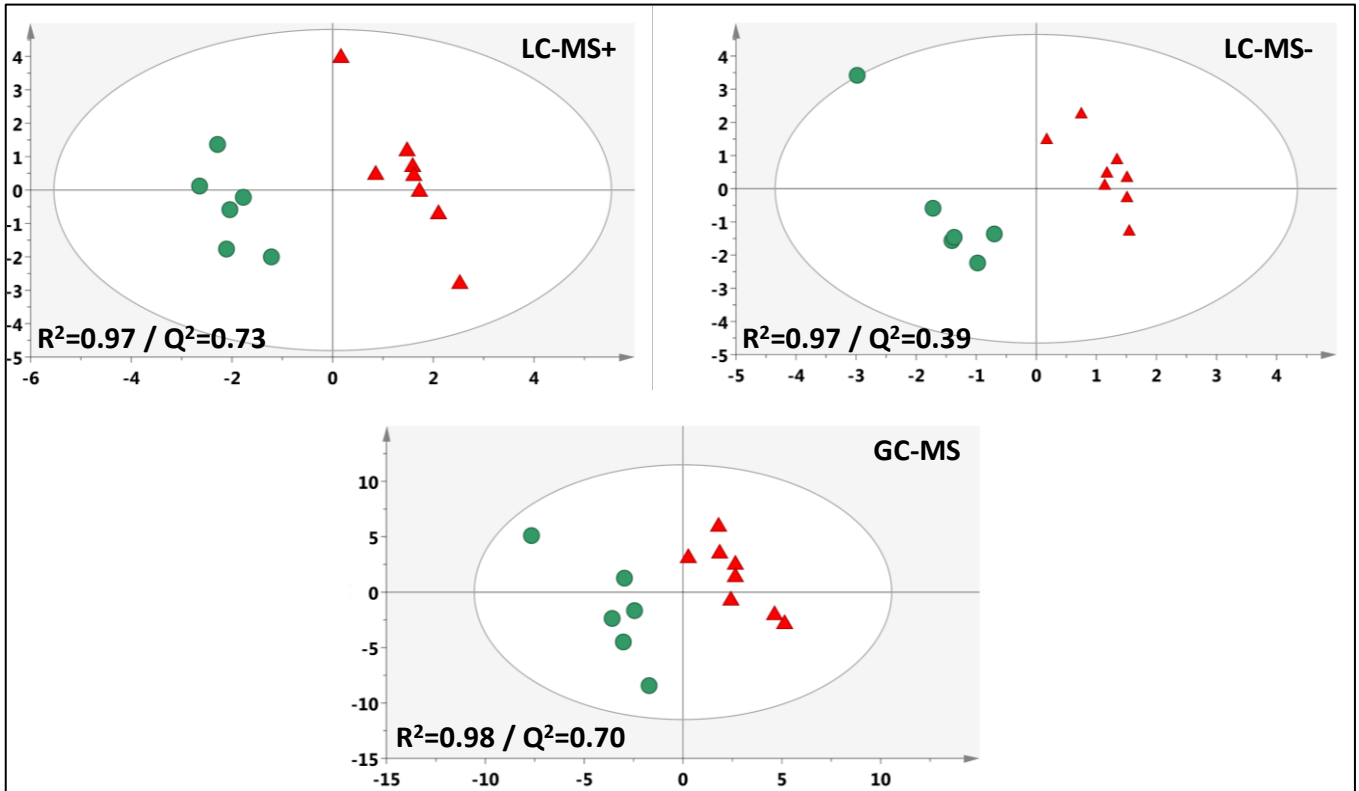


Figura 11. Modelos PLS-DA de los no alérgicos vs. graves que muestran la separación de las muestras en las 3 técnicas. Leyenda: "No alérgicos" (●; círculo verde), "Pacientes graves alérgicos a profilina" (▲; triángulo rojo).

En el modelo de LC-MS+ se observaron los mejores parámetros del modelo y una buena separación de los grupos, por lo que a partir del cual se realizó un modelo OPLS-DA (Figura 12B) para obtener las diferencias exclusivamente de acuerdo con la clase⁵². El modelo de OPLS-DA mostró parámetros de buena calidad ($R^2 = 0.99$, $Q^2 = 0.75$) y se validó utilizando el enfoque de " validación cruzada dejando uno fuera ", es una técnica utilizada para evaluar los resultados de un análisis estadístico y consiste en formar 3 grupos con los casos del modelo a evaluar repartidos entre ellos de forma aleatoria.

Después se realiza un nuevo modelo con dos de los grupos y se predicen las muestras que se encuentran en el grupo que queda fuera, estableciéndose un porcentaje de predicción del modelo en base a los aciertos (todas las muestras tienen que haber sido predichas al menos una vez) y se obtuvo una precisión de predicción del 92%, por lo que el modelo se usó para asignar una clase al grupo de “pacientes no graves alérgicos a profilina” (Figura 12B), siguiendo un enfoque similar a otros autores⁵³⁻⁵⁵. Las muestras se agruparon en círculos de acuerdo con el algoritmo matemático OPLS-DA (Tabla 5). Los pacientes con una puntuación predicha superior a 0.75, relacionados con los no alérgicos, se clasificaron como "leves". Del mismo modo, aquellos con una puntuación superior a 0.75, más cercanos a los "pacientes graves alérgicos a profilina", se clasificaron como "graves", mientras que el resto de las muestras se clasificaron como "moderados".

En consecuencia, las muestras se estratificaron en cuatro grupos: "no alérgicos", "leves", "moderados" y "graves". En resumen, el modelo de no alérgicos vs. graves en LC-MS en polaridad positiva permitió la clasificación de los "pacientes no graves alérgicos a profilina" que no pudieron clasificarse correctamente mediante la prueba de provocación oral con profilina. Las muestras se representaron de acuerdo con su clasificación metabolómica utilizando un modelo de PCA, que mostró una clara tendencia a separar el grupo "leve" de los grupos "grave" y "moderado" (Figura 12C). Además, con el objetivo de mostrar las diferencias entre los grupos, se realizó un análisis discriminante PLS-DA para cada par de grupos (Figura 13). Los resultados produjeron que al menos un modelo para cada una de las comparaciones por pares presentará buenos parámetros de calidad de los modelos. Estos resultados demostraban que había diferencias metabólicas reales entre los grupos.

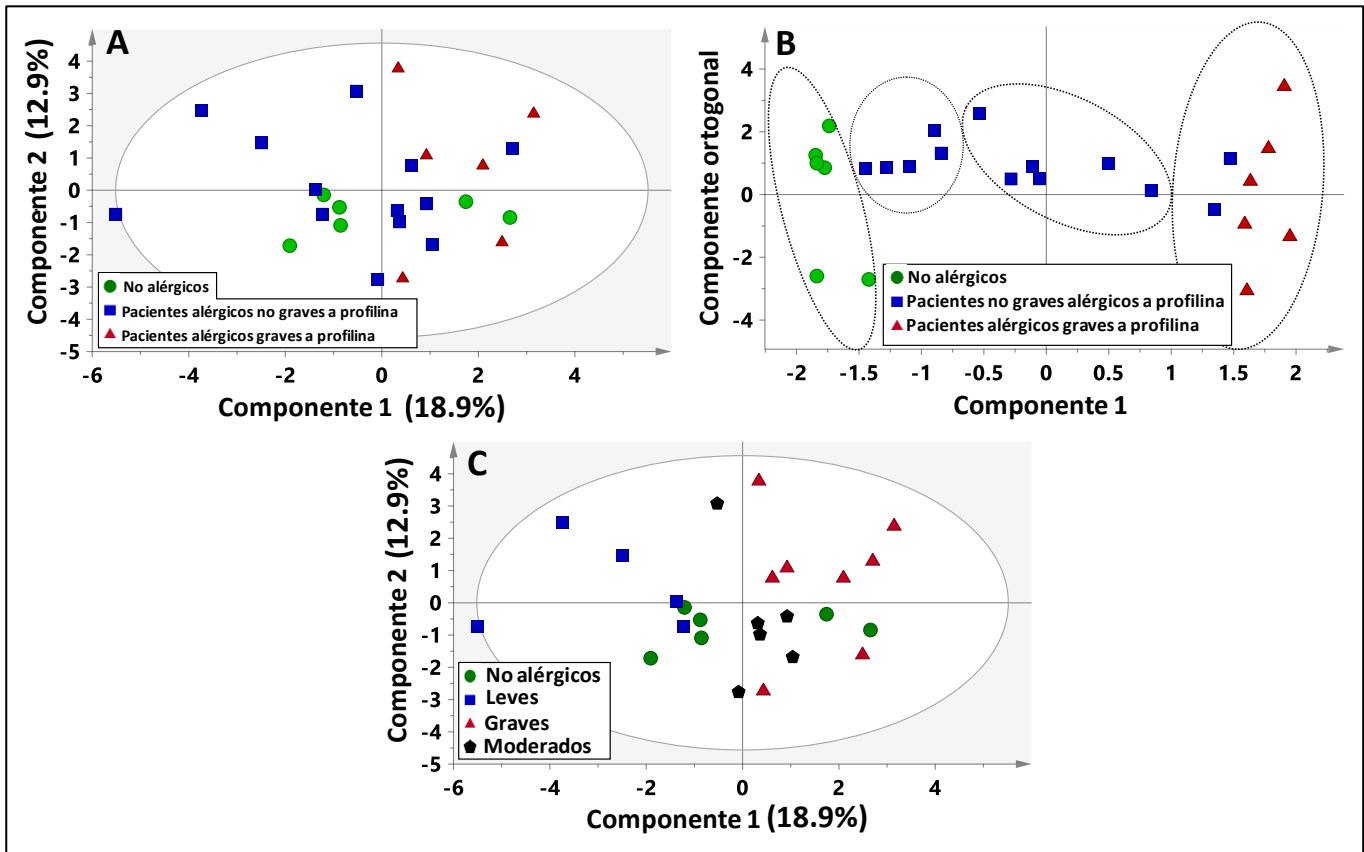


Figura 12. Análisis multivariantes no supervisado y supervisado de los datos del modo LC-MS positivo utilizados para la re-clasificación de los "pacientes no severos con perfil de alergia". (A) Modelo PCA del conjunto de muestras. Leyenda: "No alérgicos" (●; círculo verde), "Pacientes no graves alérgicos a profilina" (■; cuadrado azul), "Pacientes graves alérgicos a profilina" (▲; triángulo rojo). (B) modelo de predicción OPLS-DA; $R^2 = 0.99$, $Q^2 = 0.75$. Leyenda: muestras de grupo de trabajo (círculo verde ● - sujetos "no alérgicos"; triángulo rojo ▲ - "Pacientes graves alérgicos a profilina", muestras de predicción (cuadrado azul ■ - "Pacientes no graves alérgicos a profilina"). (C) Modelo PCA graficado usando una nueva clasificación. Leyenda: "no alérgicos" (●; círculo verde), "leves" (■; cuadrado azul), "moderados" (◼; pentágono negro), "graves" (▲; triángulo rojo). Se utilizó transformación logarítmica y escalado centrado para los modelos.

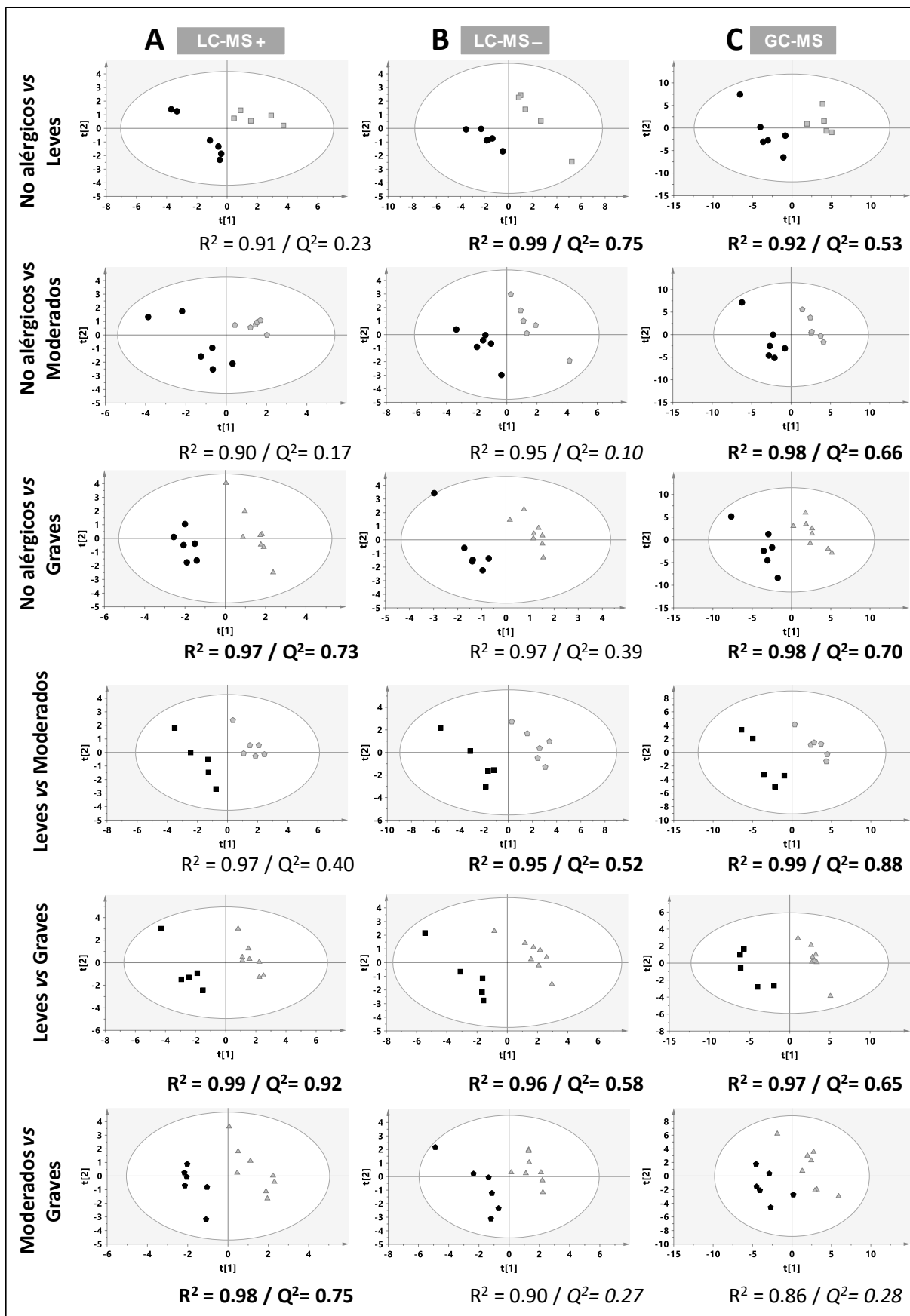


Figura 13. Modelos PLS-DA para cada comparación por pares en las tres técnicas complementarias. (Leyenda: "no alérgico": círculo, "leve": cuadrado, "moderado": pentágono, "grave": triángulo). Los datos tenían transformación logarítmica y escalado centrado. * Los caracteres en negrita señalan parámetros de calidad adecuados para el modelo.

Descripción del perfil metabólico de los diferentes grupos

Después de analizar las tendencias por análisis multivariante, se seleccionaron las variables significativas mediante análisis univariante. El número de variables significativas entre los grupos se representó mediante diagramas de Venn, (Figura 14) que son diagramas consistentes en dos o más áreas circulares que representan sendos conjuntos (totalidad de elementos que tienen una característica común) que se intersecan y que comparten los subconjuntos representados por las áreas comunes. Se observaron más diferencias en la comparación "leve vs. grave" que entre "grave vs. moderado".

Además, el número de veces de cambio se representó mediante "heatmaps". Un "heatmap" es una representación gráfica de datos que se representa como colores. En este caso, se ha representado el nivel de abundancia de cada metabolito en cada una de las muestras de dos grupos. La escala de colores va de rojo (aumentados) a azul (disminuidos). Este gráfico se unió a la utilización de agrupamientos jerárquicos, que son un método no supervisado que permite agrupar tanto casos como variables, que comienza con el cálculo de la matriz de distancias entre los elementos de la muestra (casos o variables). A continuación, se buscan los dos elementos más próximos y se agrupan en un conglomerado, el conglomerado resultante es indivisible a partir de ese momento de ahí el nombre de jerárquico, de esta manera se van agrupando los elementos en conglomerados cada vez más grande y más heterogéneos hasta llegar al último paso, en el que todos los elementos muestrales quedan agrupados en un único conglomerado global (Figura 15).

En general, los resultados sugieren que hay entidades específicas que pueden caracterizar cada fenotipo, especialmente al "grave".

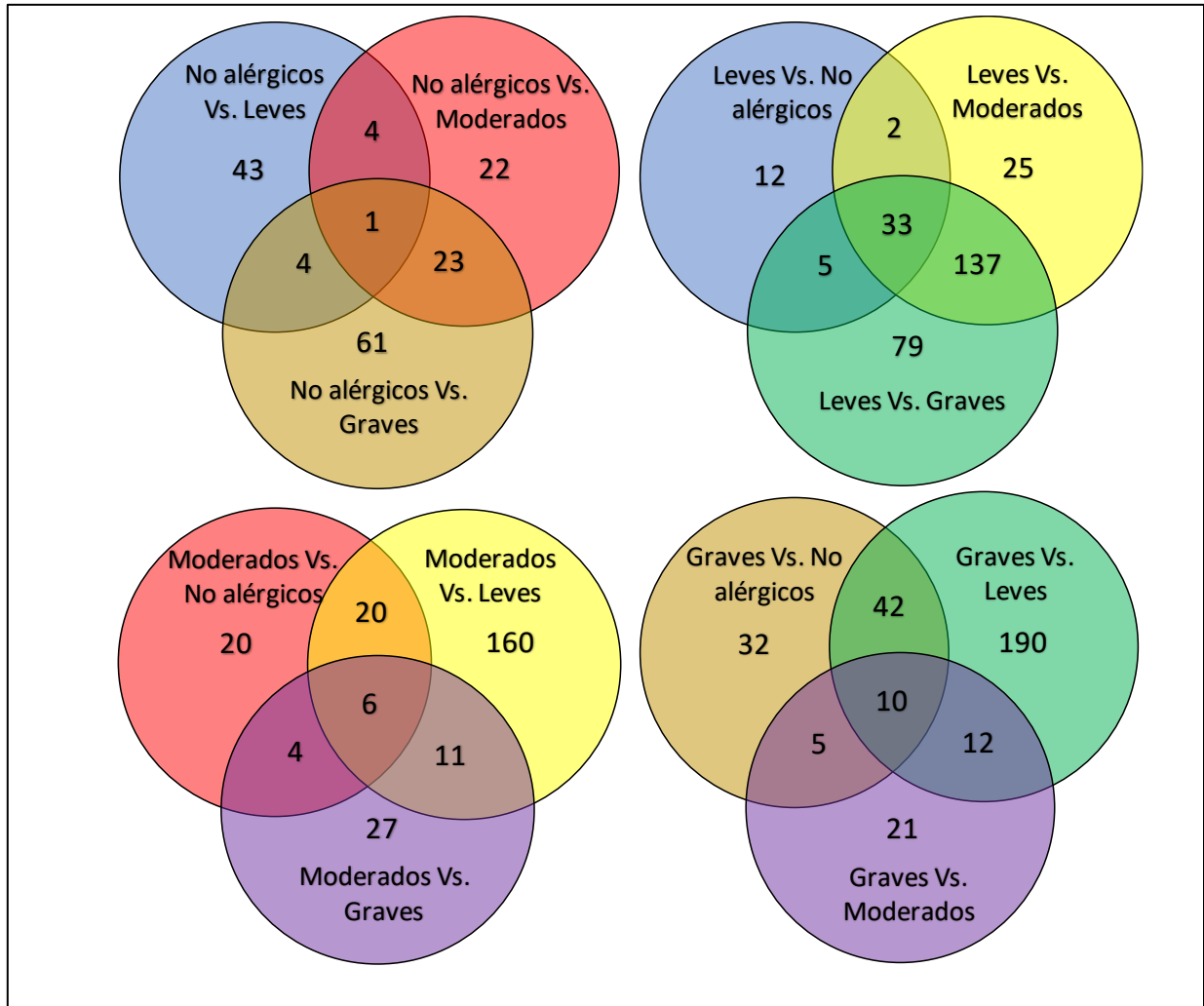


Figura 14. Diagramas de Venn de los metabolitos significativos entre cada una de las diferentes comparaciones de los grupos.

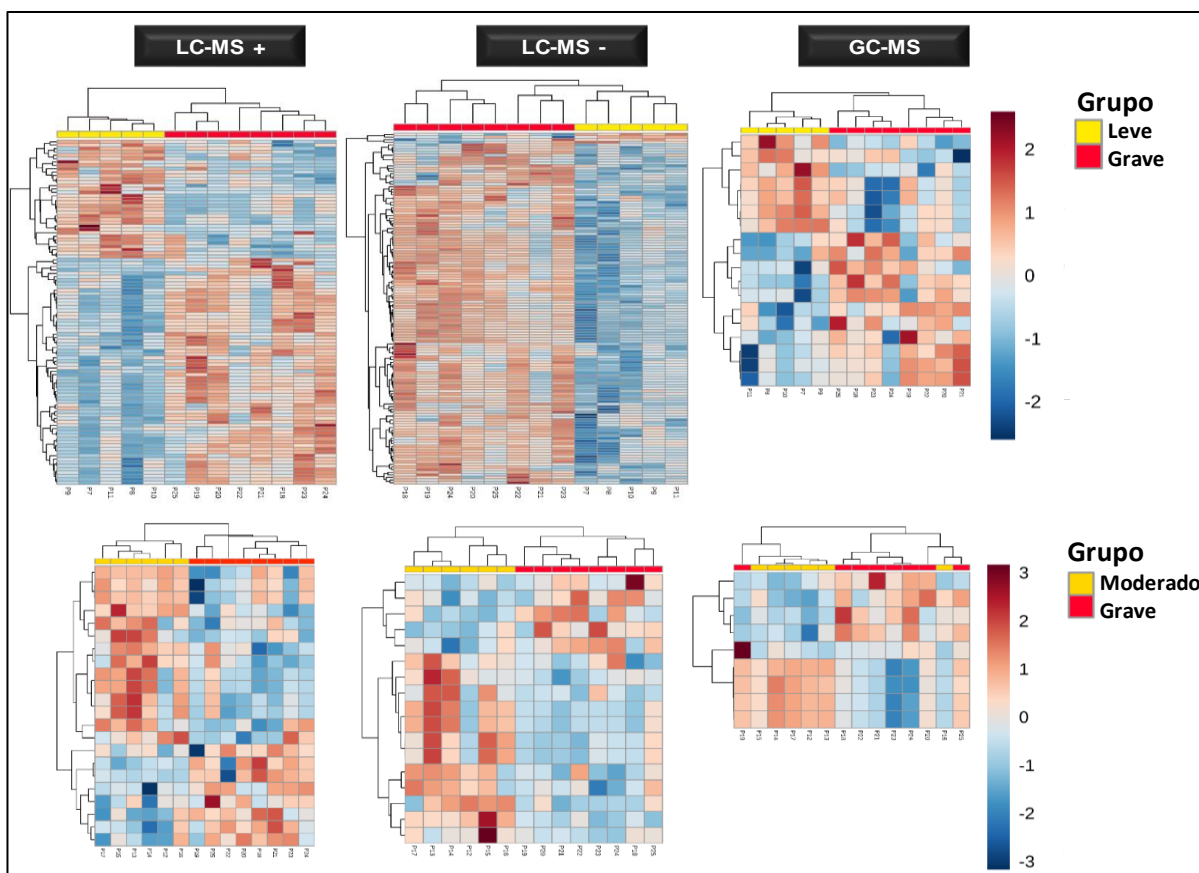


Figura 15. Las señales significativas utilizando la prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$) entre los grupos "leves vs. graves" y "moderados vs. graves" se representaron en "heatmaps" mediante un agrupamiento jerárquico de las muestras.

La identificación tentativa mediante bases de datos web se realizó en 182 metabolitos para LC-MS positivo y 194 para polaridad negativa. De estos, un total de 319 m/z valores para ambas polaridades fueron encontrados y seleccionados para experimentos de MS/MS. Posteriormente, en total se identificaron 62 m/z valores por su patrón de fragmentación. Posteriormente, se describieron 45 metabolitos con una identificación única para ambas polaridades. Finalmente, se confirmaron 22 metabolitos utilizando estándares comerciales.

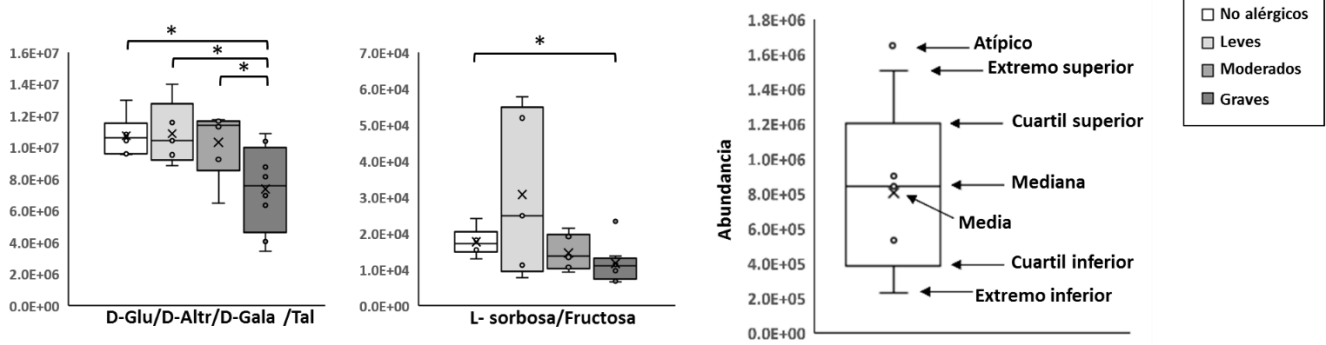
Una vez que se confirmaron las entidades significativas por MS/MS de las entidades significativas analizadas por LC-MS (19 en polaridad positiva y 25 en negativa) junto con los metabolitos significativos de GC-MS (30 metabolitos), se incluyeron un total de 74 compuestos que se recogen en la Tabla 6 y que abarcan carbohidratos (GC-MS), esfingolípidos (LC-MS+ y LC-MS-), lisofosfolípidos (LC-MS+ y LC-MS-), carnitinas (LC-MS+), aminoácidos (LC-MS ambas polaridades y GC-MS), ácidos grasos (LC-MS- y GC-MS) y ácidos orgánicos (LC-MS- y GC-MS). Se ha dejado una sola ID en caso de que el mismo metabolito se vea en las 2 técnicas, el criterio de selección está basado en que técnica es mejor para medir el metabolito específico, por ejemplo, los aminoácidos en GC-MS porque en LC-MS salen en el tiempo de RT del frente. Sus FC se calcularon en las comparaciones por pares y se resumen en la Tabla 7. La mayoría de los metabolitos presentaron niveles elevados en el grupo "grave" en comparación con el grupo "leve".

A continuación, las trayectorias de los metabolitos que hemos considerado más representativos de las distintas rutas biológicas encontradas mostraron un aumento significativo a lo largo de la gravedad de la enfermedad, como la mayoría de los lisofosfolípidos (LFL), esfinganina-1-fosfato, S1P, adenosina y lactato, a diferencia de los carbohidratos, la carnitina y la esfinganina-C17, que disminuyeron a lo largo de la gravedad (Figura 16).

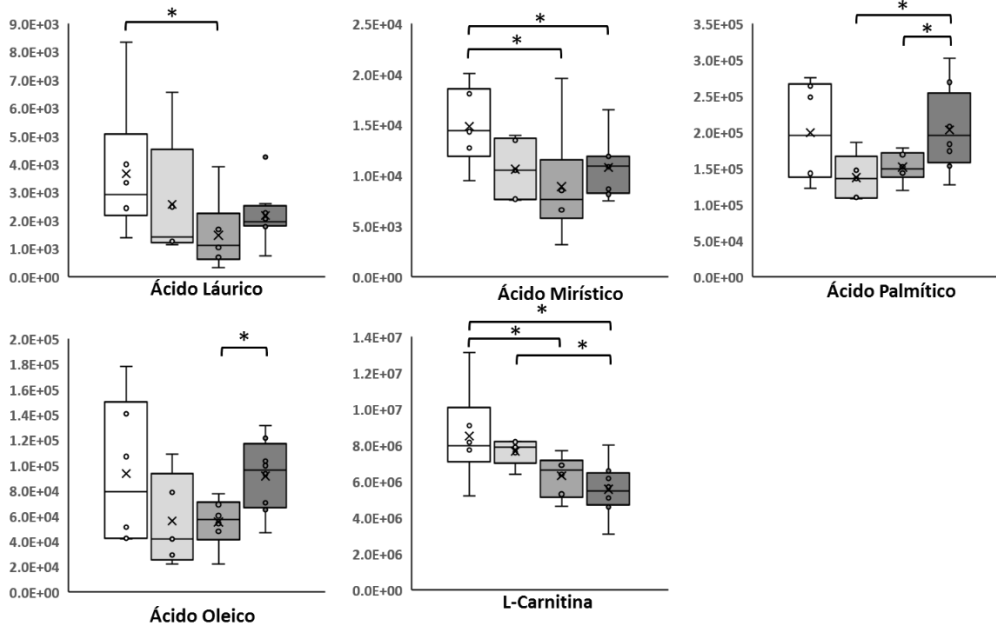
En primer lugar, se observó una alteración en el metabolismo energético celular debido a una disminución en los niveles de compuestos relacionados con la glucólisis (como las hexosas, pentosas y piruvato), mientras que el lactato aumentó en el grupo de los graves respecto del resto de grupos. Esto sugiere un consumo de carbohidratos que se metabolizan a lactato en el grupo "grave". Por otro lado, los lípidos relacionados con la membrana y la mayoría de las lisofosfolípidos (LFC) presentaron trayectorias similares entre sí y crecientes con la gravedad, que, junto con la esfingosina, S1P, esfinganina-1-fosfato y esfinganina-C17 indicaron que la señalización de fosfolípidos y esfingolípidos se activó continuamente a lo largo de la gravedad. Además, aunque la función de los xenoesfingolípidos aún no se ha definido por completo en la literatura, su disminución de

los niveles a lo largo de la gravedad sugiere una biosíntesis continua de S1P. Además, los precursores de ARA; ácido mirístico y láurico disminuyeron en "leves" y "moderados", y aumentaron en el grupo "grave". En resumen, los metabolitos que fueron significativamente diferentes en el fenotipo "grave" apuntan a una alteración en el metabolismo energético, de fosfolípidos y de esfingolípidos.

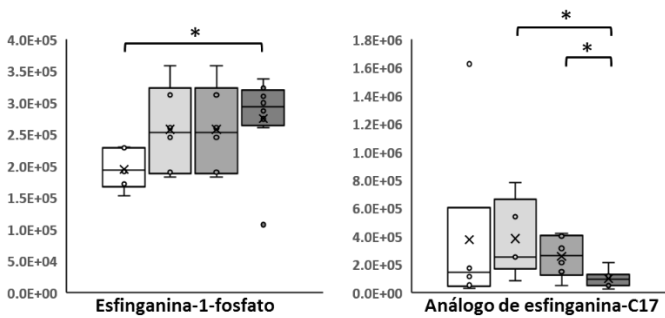
A. METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS



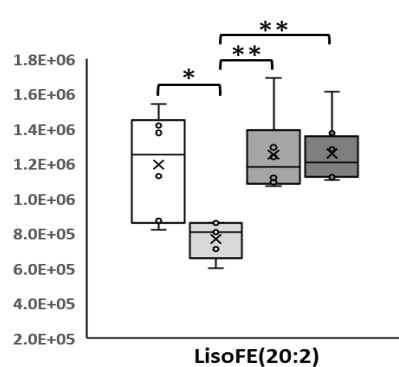
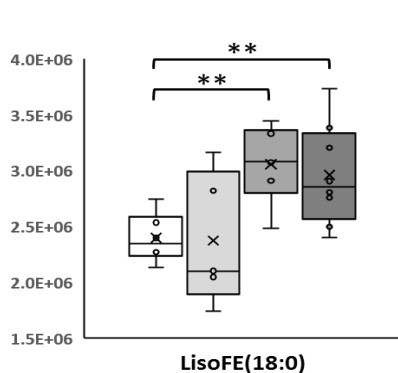
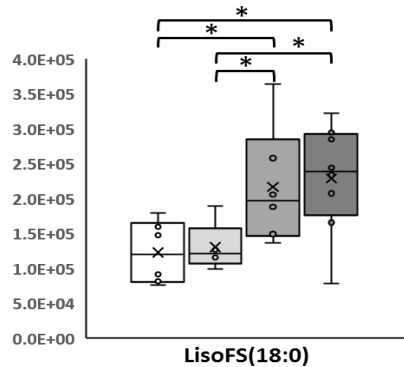
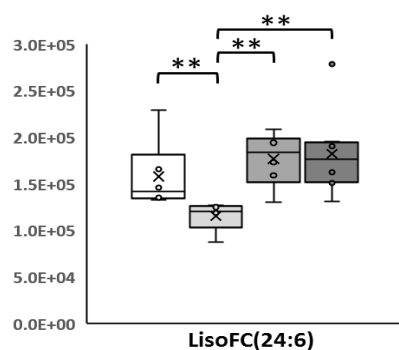
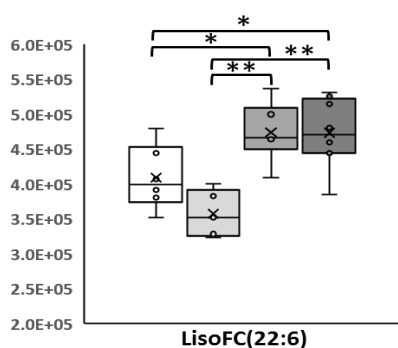
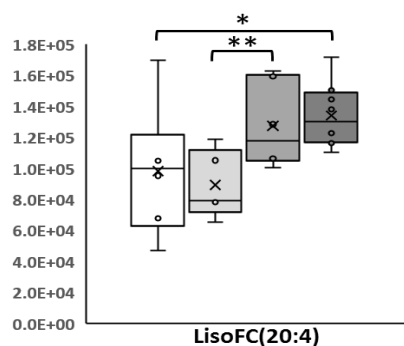
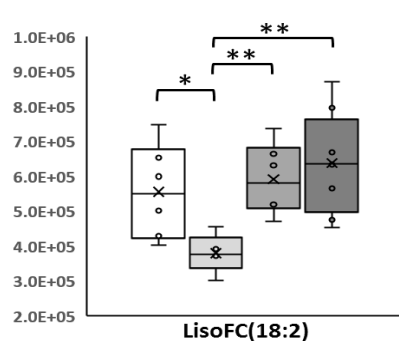
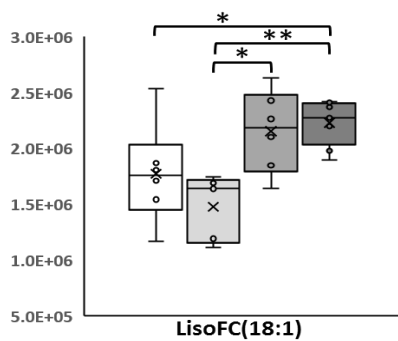
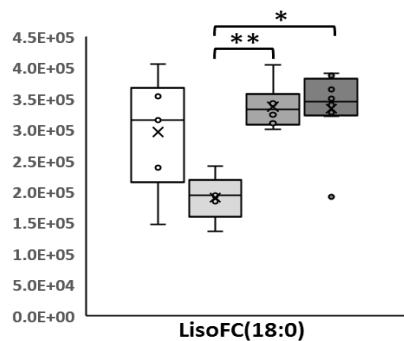
B. METABOLISMO DE ÁCIDOS GRASOS



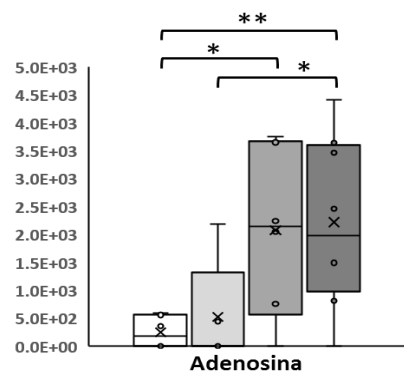
C. METABOLISMO DE ESFINGOLÍPIDOS



D. METABOLISMO DE LISOFOSFOLIPIDOS



E. OTROS



F. Principales trayectorias de metabolitos más representativos de cada ruta

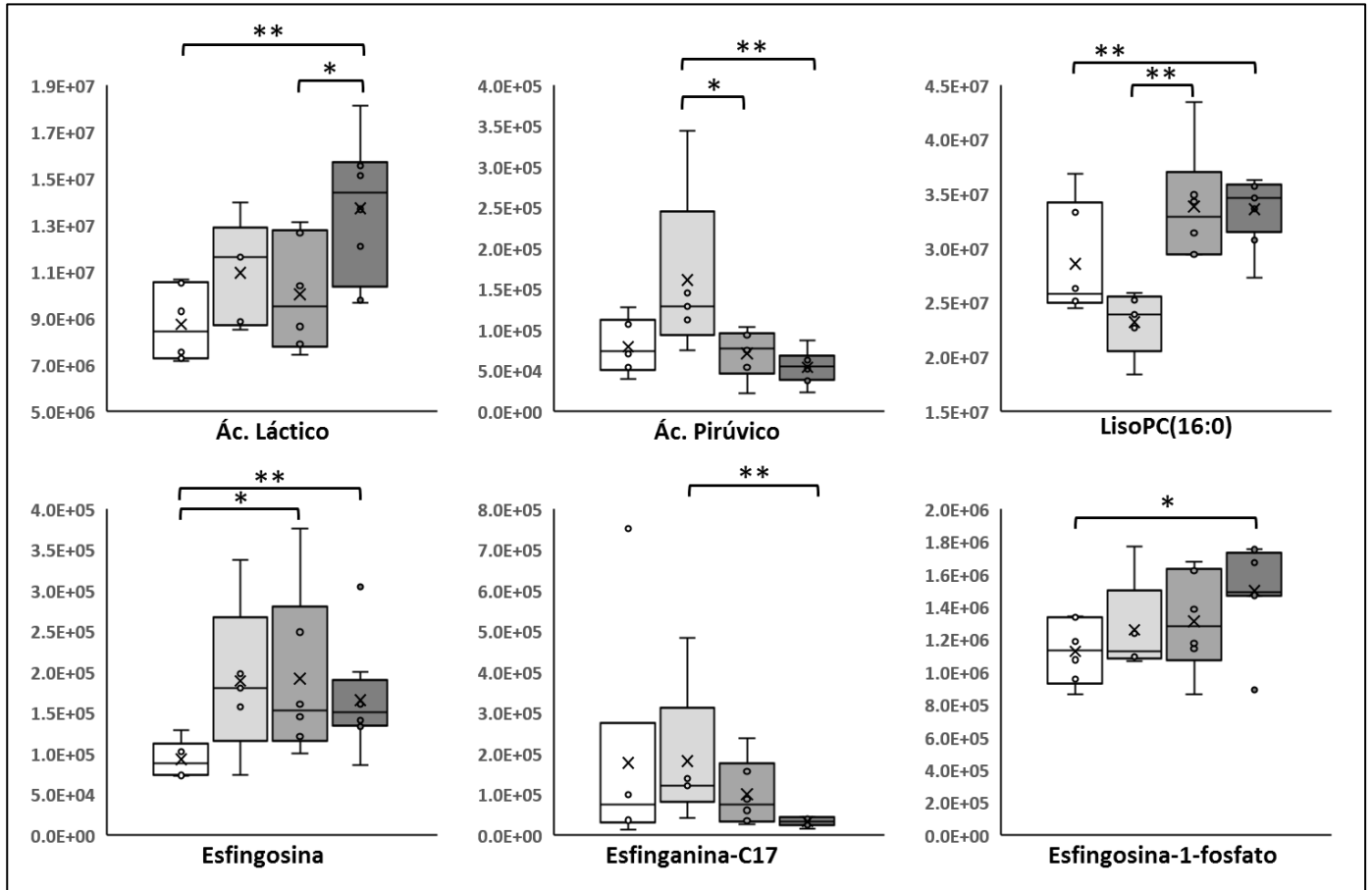


Figura 16. Trayectorias de los principales metabolitos estadísticamente significativos para alguna de las comparaciones. La gráfica de cajas y bigotes consiste en una caja rectangular, donde los lados más largos muestran el recorrido intercuartílico. Este rectángulo está dividido por un segmento vertical que indica dónde se posiciona la mediana (coincide con el segundo cuartil) y por lo tanto su relación con los cuartiles primero (superior) y tercero (inferior). Esta caja se ubica a escala sobre un segmento que tiene como extremos los valores mínimo y máximo de la variable. Las líneas que sobresalen de la caja se llaman bigotes. Estos bigotes tienen un límite de prolongación (extremos superior e inferior) de modo que cualquier dato o caso que no se encuentre dentro de este rango es identificado como valor atípico.

Tabla 5. Resultados del modelo de predicción del OPLS-DA.

Paciente	Estado Clínico inicial	Grupo asignado*	Puntuación predicha*	Grupo asignado&	Puntuación predicha	Grupo final
P.1	No alérgico	1	1.006	0	-0.006	No alérgico
P.2	No alérgico	1	1.026	0	-0.026	No alérgico
P.3	No alérgico	1	1.024	0	-0.024	No alérgico
P.4	No alérgico	1	0.904	0	0.096	No alérgico
P.5	No alérgico	1	1.024	0	-0.024	No alérgico
P.6	No alérgico	1	0.994	0	0.006	No alérgico
P.7	Paciente no grave alérgico a profilina	—	0.756	—	0.244	Leve
P.8	Paciente no grave alérgico a profilina	—	0.740	—	0.260	Leve
P.9	Paciente no grave alérgico a profilina	—	0.912	—	0.088	Leve
P.10	Paciente no grave alérgico a profilina	—	0.864	—	0.136	Leve
P.11	Paciente no grave alérgico a profilina	—	0.812	—	0.188	Leve
P.12	Paciente no grave alérgico a profilina	—	0.260	—	0.740	Moderado
P.13	Paciente no grave alérgico a profilina	—	0.531	—	0.469	Moderado
P.14	Paciente no grave alérgico a profilina	—	0.580	—	0.420	Moderado
P.15	Paciente no grave alérgico a profilina	—	0.516	—	0.484	Moderado
P.16	Paciente no grave alérgico a profilina	—	0.358	—	0.642	Moderado
P.17	Paciente no grave alérgico a profilina	—	0.651	—	0.349	Moderado
P.21	Paciente no grave alérgico a profilina	—	0.080	—	0.920	Grave
P.22	Paciente no grave alérgico a profilina	—	0.116	—	0.884	Grave

P.18	Paciente grave alérgico a profilina	0	-0.042	1	1.042	Grave
P.19	Paciente grave alérgico a profilina	0	-0.054	1	1.054	Grave
P.20	Paciente grave alérgico a profilina	0	0.035	1	0.965	Grave
P.23	Paciente grave alérgico a profilina	0	0.043	1	0.957	Grave
P.24	Paciente grave alérgico a profilina	0	-0.008	1	1.008	Grave
P.25	Paciente grave alérgico a profilina	0	0.048	1	0.952	Grave

*Individuos no alérgicos; &Pacientes graves alérgicos a profilina; Valores utilizados para construir el modelo OPLS-DA.

Tabla 6. Metabolitos significativos de LC-MS+, LC-MS– and GC-MS.

Nº	Técnica	Compuesto	m/z (Da) (LC-MS) / ion diana (GC-MS)	Masa (Da)	RT (min)	Fórmula	Error (ppm)	Aducto	CV en QCs (%)	p valor	p BH
1	LC-MS+	Acetilcarnitina*	204.1221	203.1152	0.69	C9H17NO4	-4.4	M+H	3.5	0.039	0.046
2	GC-MS	Adenosina	–	236.0	23.85	C10H13N5O4	–	–	16.3	0.021	0.040
3	GC-MS	Ác. Aminoisobutírico	–	218.0	12.48	C4H9NO2	–	–	22.2	0.041	0.045
4	GC-MS	Ác. Aminomalónico	–	320.1	12.47	C3H5NO4	–	–	24.7	0.045	0.045
5	LC-MS+	Esfinganina-C17&	288.2891	287.2802	11.24	C17H37NO2	-1.7	M+H	2.8	0.035	0.043
6	LC-MS+	Esfinganina-C17*	288.2894	287.2820	11.98	C17H37NO2	-0.7	M+H	2.5	0.081	0.104
7	LC-MS+	Carnitina*	162.1119	161.1046	0.69	C7H15NO3	-3.1	M+H	2.1	0.017	0.042
8	LC-MS+	Ác. Quenodesoxicólico conjugado con glicina	450.3215	449.3139	12.45	C26H43NO5	0.4	M+H	1.7	0.232	0.232
9	GC-MS	Cisteína	–	220.0	13.58	C3H7NO2S	–	–	11.4	0.016	0.040
10	GC-MS	D-alosa	–	319.2	17.54	C6H12O6	–	–	7.7	0.050	0.106
11	GC-MS	D-glucosa/D-altrosa/D-galactosa/Talosa	–	319.2	17.34	C6H12O6	–	–	7.9	0.037	0.045
12	LC-MS-	Ác. Dihidroxicolanoico	391.2856	392.2924	10.89	C24H40O4	0.3	M-H	5.8	0.099	0.106
13	GC-MS	D-lixosilamina	–	103.0	14.78	C5H11NO4	–	–	8.3	0.036	0.045
14	GC-MS	D-manosa/D-alosa	–	319.2	17.22	C6H12O	–	–	10.6	0.011	0.040
15	GC-MS	D-manitol/D-manosa/D-sorbitol	–	319.0	17.75	C6H14O6	–	–	17.6	0.058	0.106
16	GC-MS	Ác. Glicérico	–	189.1	10.62	C3H6O4	–	–	5.7	0.113	0.147

17	LC-MS+	Hexanoilcarnitina*	260.1861	259.1790	0.99	C13H25NO4	1.9	M+H	1.3	0.196	0.204
18	GC-MS	Hipoxantina	–	265.1	16.41	C5H2N4O	–	–	15.2	0.015	0.040
19	GC-MS	L-sorbosa/Fructosa	–	103.0	17.16	C6H12O6	–	–	7.2	0.009	0.040
20	GC-MS	Lactamida	–	100.0	7.94	C3H7NO2	–	–	21.3	0.287	0.295
21	GC-MS	Ác. Láctico	–	117.1	6.81	C3H6O3	–	–	4.9	0.021	0.040
22	GC-MS	Ác. Láurico	–	117.0	14.71	C12H24O2	–	–	15.2	0.085	0.135
23	GC-MS	Leucina	–	158.1	9.83	C6H13NO2	–	–	12.3	0.097	0.139
24	LC-MS+	Leucil-prolina*	229.1544	228.1471	0.70	C11H20N2O3	-0.9	M+H	3.5	0.051	0.081
25	GC-MS	L-metionina	–	61.0	11.75	C5H11NO2S	–	–	11.8	0.057	0.106
26	LC-MS-	LisoFC (P-16:0)/ LisoFC (O-16:1)	524.3348	479.3366	21.44	C24H50NO6P	-2.1	M+COOH	4.2	0.011	0.027
27	LC-MS-	LisoFC (P-18:0)/ LisoFC (O-18:1)	552.3658	553.3793	26.01	C26H54NO6P	-2.6	M+COOH	10.1	0.018	0.028
28	LC-MS-	LisoFC (P-18:0)/ LisoFC (O-18:1)	552.366	553.3747	22.23	C26H54NO6P	-2.2	M+COOH	3.5	0.021	0.028
29	LC-MS-	LisoFC (P-18:1)/ LisoFC (O-18:2)	550.3513	551.3602	22.30	C26H52NO6P	-0.2	M+COOH	4.8	0.048	0.049
30	LC-MS-	LisoFC(14:0)*	556.3247	557.3327	16.11	C22H46NO7P	-2.1	M+90.0320	11.9	0.021	0.028
31	LC-MS-	LisoFC(16:0)*	540.3311	541.3386	19.44	C24H50NO7P	0.8	M+COOH	3.4	0.005	0.027
32	LC-MS-	LisoFC(16:0)*	530.3023	531.3102	20.21	C24H50NO7P	0.8	M+Cl	4.8	0.016	0.027
33	LC-MS-	LisoFC(18:0)*	558.3314	559.3407	23.76	C26H54NO7P	-3.4	M+Cl	8.7	0.029	0.033
34	LC-MS-	LisoFC(18:0)*	636.3488	637.3572	24.59	C26H52NO7P	1.3	M+112.9555	5.1	0.013	0.027
35	LC-MS-	LisoFC(18:1)*	610.3716	611.3799	21.12	C26H52NO7P	-1.9	M+90.0320	8.1	0.009	0.027

36	LC-MS-	LisoFC(18:1)*	610.3708	611.3700	20.43	C26H52NO7P	-3.5	M+90.0320	9.9	0.023	0.029
37	LC-MS-	LisoFC(18:2)	554.3006	555.3098	17.88	C26H50NO7P	-2.5	M+Cl	9.5	0.011	0.027
38	LC-MS+	LisoFC(19:0)*	538.3879	537.3828	26.98	C27H56NO7P	2.4	M+H	9.2	0.040	0.046
39	LC-MS+	LisoFC(20:0)*	552.4027	551.3953	29.50	C28H58NO7P	0.7	M+H	6.2	0.047	0.049
40	LC-MS-	LisoFC(20:1)	594.377	595.3855	25.12	C28H56NO7P	-1.1	M+COOH	4.8	0.019	0.028
41	LC-MS+	LisoFC(20:1)	550.3868	549.3790	25.13	C28H56NO7P	0.4	M+H	2.6	0.090	0.110
42	LC-MS-	LisoFC(20:2)	592.3626	593.3622	21.49	C28H54NO7P	1.1	M+COOH	10.3	0.042	0.044
43	LC-MS+	LisoFC(20:2)	548.371	547.3632	22.18	C28H54NO7P	0.0	M+H	10.4	0.004	0.042
44	LC-MS-	LisoFC(20:4)	656.3191	657.3357	17.99	C28H50NO7P	1.8	M+112.9555	19.3	0.019	0.028
45	LC-MS-	LisoFC(22:6)	612.3382	613.2694	19.43	C30H50NO7P	13.2	M+COOH	4.5	0.004	0.027
46	LC-MS-	LisoFC(24:6)	640.3678	641.3887	21.12	C32H54NO7P	9.7	M+COOH	7.6	0.006	0.027
47	LC-MS+	LisoFC(O-16:0)	482.3601	481.3527	21.43	C24H52NO6P	-0.6	M+H	4.9	0.015	0.042
48	LC-MS-	LisoFC(O-18:0)	554.3844	555.3916	26.20	C26H56NO6P	3.3	M+COOH	9.1	0.007	0.027
49	LC-MS+	LisoFE(18:0)*	464.3137	463.3080	21.83	C23H48NO7P	0.4	M+H-H2O	8.9	0.005	0.042
50	LC-MS+	LisoFE(18:0)*	482.3247	481.3172	24.03	C23H48NO7P	1.5	M+H	2.5	0.019	0.042
51	LC-MS-	LisoFE(20:2)	504.3088	505.3172	18.53	C25H48NO7P	-1.6	M-H	7.0	0.013	0.027
52	LC-MS-	LisoFE(20:2)	504.3088	505.3176	17.88	C25H48NO7P	-1.6	M-H	16.8	0.018	0.028
53	LC-MS+	LisoFE(P-16:0)	438.2983	437.2904	20.96	C21H44NO6P	1.1	M+H	5.2	0.008	0.042
54	LC-MS+	LisoFE(P-18:0)/ LisoFE(O-18:1)	466.3299	465.3239	25.28	C23H48NO6P	1.7	M+H	7.4	0.002	0.042
55	LC-MS-	LisoFS(18:0)*	524.2981	525.3077	27.15	C24H48NO9P	-2.7	M-H	7.3	0.019	0.028

56	GC-MS	Metil-beta-D-galactopiranosido	—	217.0	16.88	C6H12O6	—	—	3.5	0.133	0.150
57	GC-MS	Mio-inositol	—	217.0	19.26	C6H12O6	—	—	17.8	0.264	0.280
58	GC-MS	Ác. Mirístico	—	285.0	16.88	C14H28O2	—	—	5.9	0.056	0.056
59	GC-MS	Ác. Oleico	—	117.0	20.44	C18H34O2	—	—	7.1	0.207	0.207
60	GC-MS	Ác. Oxálico	—	147.1	7.96	C2H2O4	—	—	27.3	0.326	0.326
61	GC-MS	Ác. Palmítico	—	117.0	18.85	C16H32O2	—	—	7.5	0.111	0.147
62	GC-MS	Fenilalanina	—	218.1	14.41	C9H11NO2	—	—	18.3	0.024	0.040
63	GC-MS	Ác. Pirúvico	—	174.1	6.64	C3H4O3	—	—	3.2	0.016	0.040
64	GC-MS	Serina	—	116.1	9.65	C3H7NO3	—	—	16.8	0.124	0.148
65	LC-MS-	Esfinganina-1-fosfato*	380.257	381.2643	16.59	C18H40NO5P	-0.5	M-H	6.3	0.100	0.106
66	LC-MS+	Esfingosina*	300.2893	299.2801	15.22	C18H37NO2	-1.0	M+H	6.1	0.034	0.043
67	LC-MS-	Esfingosina-fosfato oxidada (No descrita)	376.2253	377.2336	13.15	C18H36NO5P	-1.6	M-H	1.9	0.163	0.163
68	LC-MS-	Sphingosine-1-phosphate*	378.2409	379.2489	15.69	C18H38NO5P	-1.8	M-H	2.2	0.112	0.116
69	GC-MS	Tagatosa	—	307.2	17.16	C6H12O6	—	—	9.3	0.063	0.106
70	GC-MS	Ác. Trihidroxibutírico	—	292.0	13.58	C4H8O5	—	—	8.1	0.005	0.040
71	LC-MS+	Desconocido, con estructura similar a un esfingolípido	304.2997	303.2922	15.61	C21H38N	-0.3	M+H	13.6	0.012	0.042
72	GC-MS	Urea	—	189.1	9.43	CH4N2O	—	—	8.8	0.146	0.160
73	GC-MS	Valina	—	144.1	9.04	C5H11NO2	—	—	6.8	0.043	0.045
74	LC-MS+	Xestoaminol C	230.2475	229.2400	10.20	C14H31NO	-1.3	M+H	8.9	0.058	0.087

NOTA: & Misma masa, *m/z* y patrón de fragmentación que el ID estándar * confirmado con el estándar comercial. Los de *p* valor y los valores de *p* BH que no se resaltan en verde fueron significativos en la comparación por pares utilizando la prueba de U de Mann Whitney.

Tabla 7. Comparaciones por pares que muestran la significancia y el % de cambio entre los grupos experimentales.

Nº	Técnica	Compuesto	<i>m/z</i> (Da) (LC-MS) / ion target (GC-MS)	Masa (Da)	RT (min)	No alérgicos vs. Leves		No alérgicos vs. Moderados		No alérgicos vs. Graves		Leves vs. Moderados		Leves vs. Graves		Moderados vs. Graves	
						% Leve	<i>p</i> valor	% Moderado	<i>p</i> valor	% Grave	<i>p</i> valor	% Moderado	<i>p</i> valor	% Grave	<i>p</i> valor	% Grave	<i>p</i> valor
1	LC-MS+	Acetilcarnitina*	204.1221	203.1152	0.69	-18.9	0.429	-41.0	0.009	-33.9	0.081	-27.2	0.082	-18.5	0.127	12.0	0.852
2	GC-MS	Adenosina	—	236.0	23.85	108.8	1.000	723.2	0.028	781.0	0.009	294.3	0.095	322.0	0.048	7.0	0.982
3	GC-MS	Ác. Aminoisobutírico	—	218.0	12.48	-42.4	0.082	23.6	0.240	14.1	0.852	114.4	0.004	97.9	0.065	-7.7	0.414
4	GC-MS	Ác. Aminomalónico	—	320.1	12.47	-41.9	0.126	19.7	0.394	11.3	0.852	105.8	0.004	91.4	0.045	-7.0	0.345
5	LC-MS+	Esfinganina-C17*	288.2891	287.2802	11.24	2.3	0.247	-43.5	1.000	-81.4	0.108	-44.7	0.429	-81.8	0.006	-67.1	0.059
6	LC-MS+	Esfinganina-C17*	288.2894	287.2820	11.98	1.7	0.429	-31.4	0.485	-73.8	0.414	-32.5	0.537	-74.2	0.019	-61.8	0.043
7	LC-MS+	Carnitina*	162.1119	161.1046	0.69	-9.9	0.792	-25.8	0.041	-34.7	0.029	-17.6	0.052	-27.5	0.019	-12.0	0.282
8	LC-MS+	Ác. Quenodesoxicólico conjugado con glicina	450.3215	449.3139	12.45	-33.2	0.662	-44.2	0.589	-63.1	0.181	-16.4	0.662	-44.8	0.045	-34.0	0.414
9	GC-MS	Cisteína	—	220.0	13.58	-53.3	0.004	-16.5	0.589	-42.5	0.029	78.6	0.052	23.0	0.284	-31.2	0.142
10	GC-MS	D-Alosa	—	319.2	17.54	-0.5	0.662	-1.8	0.699	-33.0	0.029	-1.3	0.662	-32.7	0.065	-31.8	0.029
11	GC-MS	D-Glucosa/ D-Altrosa/ D-Galactosa /Talosa	—	319.2	17.34	1.2	0.931	-4.0	0.818	-31.3	0.020	-5.1	1.000	-32.1	0.030	-28.5	0.029
12	LC-MS-	Ác.Dihidroxicolanoico	391.2856	392.2924	10.89	-76.2	0.126	-82.7	0.041	-71.2	0.108	-27.0	0.662	21.3	0.284	66.2	0.345
13	GC-MS	D-Lixosilamina	—	103.0	14.78	10.9	1.000	-27.5	0.026	6.0	0.491	-34.7	0.017	-4.4	0.284	46.3	0.043

14	GC-MS	D-Manosa/D-Alosa	—	319.2	17.22	15.2	0.247	-12.8	0.310	-34.4	0.008	-24.3	0.177	-43.0	0.006	-24.7	0.142
15	GC-MS	D-Manitol/D-Manosa/D-Sorbitol	—	319.0	17.75	669.3	0.030	179.8	0.041	242.1	0.020	-63.6	1.000	-55.5	0.943	22.3	0.950
16	GC-MS	Ác. Glicérico	—	189.1	10.62	-37.0	0.126	-20.3	0.394	-12.8	0.345	26.4	0.329	38.3	0.019	9.5	0.345
17	LC-MS+	Hexanoilcarnitina*	260.1861	259.1790	0.99	1.0	0.931	-33.0	0.041	-19.2	0.142	-33.6	0.247	-20.0	0.524	20.6	0.662
18	GC-MS	Hipoxantina	—	265.1	16.41	15.9	0.662	118.1	0.132	388.8	0.005	88.2	0.329	321.9	0.019	124.1	0.142
19	GC-MS	L-Sorbosa/Fructosa	—	103.0	17.16	14.0	0.247	-10.5	0.240	-32.5	0.005	-21.5	0.082	-40.8	0.011	-24.5	0.142
20	GC-MS	Lactamida	—	100.0	7.94	-11.9	0.329	23.0	0.589	4.4	0.755	39.6	0.537	18.6	0.001	-15.1	0.950
21	GC-MS	Ác. Láctico	—	117.1	6.81	25.2	0.126	14.7	0.394	56.8	0.008	-8.4	0.537	25.3	0.093	36.8	0.043
22	GC-MS	Ác. Láurico	—	117.0	14.71	-29.8	0.247	-59.7	0.041	-40.5	0.181	-42.7	0.247	-15.3	0.724	47.7	0.081
23	GC-MS	Leucina	—	158.1	9.83	109.4	0.030	32.6	0.394	47.2	0.282	-36.7	0.052	-29.7	0.222	11.1	0.662
24	LC-MS+	Leucil-prolina*	229.1544	228.1471	0.70	32.9	0.030	2.5	0.937	-8.4	0.345	-22.9	0.052	-31.1	0.030	-10.7	0.282
25	GC-MS	L-Metionina	—	61.0	11.75	-10.0	0.792	27.2	0.485	41.3	0.108	41.3	0.052	56.9	0.019	11.0	0.228
26	LC-MS-	LisoFC (P-16:0)/LisoPC (O-16:1)	524.3348	479.3366	21.44	-17.8	0.429	29.0	0.180	32.1	0.043	56.9	0.017	60.6	0.002	2.4	0.950
27	LC-MS-	LisoFC (P-18:0)/LisoPC (O-18:1)	552.3658	553.3793	26.01	-40.9	0.126	30.7	0.394	16.3	0.573	121.2	0.004	96.8	0.002	-11.0	0.755
28	LC-MS-	LisoFC (P-18:0)/LisoPC (O-18:1)	552.366	553.3747	22.23	-23.6	0.329	12.9	0.485	29.2	0.108	47.9	0.030	69.3	0.003	14.5	0.228
29	LC-MS-	LisoFC (P-18:1)/LisoPC (O-18:2)	550.3513	551.3602	22.30	-22.7	0.429	19.9	0.485	19.6	0.228	55.1	0.009	54.7	0.011	-0.2	0.950
30	LC-MS-	LisoFC(14:0)*	556.3247	557.3327	16.11	14.8	0.662	29.7	0.004	44.3	0.001	12.9	0.537	25.7	0.284	11.2	0.573
31	LC-MS-	LisoFC(16:0)*	540.3311	541.3386	19.44	-18.8	0.082	18.4	0.132	17.6	0.081	45.7	0.004	44.8	0.002	-0.7	0.662
32	LC-MS-	LisoFC(16:0)*	530.3023	531.3102	20.21	-10.3	0.030	5.2	0.310	5.0	0.142	17.3	0.017	17.1	0.006	-0.2	0.755
33	LC-MS-	LisoFC(18:0)*	558.3314	559.3407	23.76	-35.6	0.082	13.9	0.699	12.9	0.345	77.1	0.004	75.4	0.011	-0.9	0.662
34	LC-MS-	LisoFC(18:0)*	636.3488	637.3572	24.59	-25.6	0.052	11.5	0.180	8.4	0.282	50.0	0.004	45.8	0.006	-2.8	0.950
35	LC-MS-	LisoFC(18:1)*	610.3716	611.3799	21.12	-16.7	0.247	21.5	0.180	25.8	0.043	45.9	0.017	51.0	0.002	3.5	0.755
36	LC-MS-	LisoFC(18:1)*	610.3708	611.3700	20.43	-13.6	0.429	16.1	0.310	24.4	0.059	34.3	0.052	43.9	0.003	7.2	0.491
37	LC-MS-	LisoFC(18:2)	554.3006	555.3098	17.88	-31.7	0.017	6.6	0.589	14.8	0.345	56.1	0.004	68.0	0.003	7.7	0.573
38	LC-MS+	LisoFC(19:0)*	538.3879	537.3828	26.98	-37.2	0.126	-1.8	1.000	6.1	0.573	56.4	0.004	69.0	0.011	8.1	0.491

39	LC-MS+	LisoFC(20:0)*	552.4027	551.3953	29.50	-22.5	0.329	28.7	0.240	13.9	0.573	66.2	0.004	47.0	0.030	-11.5	0.491
40	LC-MS-	LisoFC(20:1)	594.377	595.3855	25.12	-24.2	0.247	31.4	0.180	25.9	0.142	73.4	0.004	66.2	0.011	-4.2	0.950
41	LC-MS+	LisoFC(20:1)	550.3868	549.3790	25.13	-9.8	0.662	26.1	0.310	22.5	0.228	39.7	0.082	35.8	0.011	-2.8	1.000
42	LC-MS-	LisoFC(20:2)	592.3626	593.3622	21.49	-17.2	0.537	18.2	0.394	41.3	0.108	42.9	0.082	70.8	0.011	19.5	0.181
43	LC-MS+	LisoFC(20:2)	548.371	547.3632	22.18	-9.5	0.537	17.4	0.180	42.6	0.008	29.8	0.004	57.6	0.019	21.4	0.020
44	LC-MS-	LisoFC(20:4)	656.3191	657.3357	17.99	-9.2	0.931	29.6	0.132	36.4	0.029	42.7	0.052	50.1	0.006	5.2	0.491
45	LC-MS-	LisoFC(22:6)	612.3382	613.2694	19.43	-12.7	0.082	15.8	0.041	15.7	0.043	32.7	0.004	32.5	0.003	-0.1	0.852
46	LC-MS-	LisoFC(24:6)	640.3678	641.3887	21.12	-26.8	0.004	11.9	0.394	15.3	0.282	52.9	0.004	57.6	0.002	3.1	0.755
47	LC-MS+	LisoFC(O-16:0)	482.3601	481.3527	21.43	-13.3	0.429	17.8	0.310	32.9	0.029	35.8	0.052	53.3	0.006	12.9	0.181
48	LC-MS-	LisoFC(O-18:0)	554.3844	555.3916	26.20	-28.1	0.126	28.4	0.180	37.4	0.029	78.7	0.017	91.2	0.002	7.0	0.755
49	LC-MS+	LisoFE(18:0)*	464.3137	463.3080	21.83	9.6	0.931	68.3	0.004	56.2	0.003	53.5	0.052	42.5	0.030	-7.2	0.755
50	LC-MS+	LisoFE(18:0)*	482.3247	481.3172	24.03	-1.0	0.662	27.5	0.009	23.6	0.008	28.7	0.082	24.8	0.127	-3.1	0.573
51	LC-MS-	LisoFE(20:2)	504.3088	505.3172	18.53	-35.6	0.017	4.8	1.000	5.4	1.000	62.7	0.004	63.6	0.002	0.5	0.491
52	LC-MS-	LisoFE(20:2)	504.3088	505.3176	17.88	-38.6	0.052	7.3	0.699	4.9	0.852	74.7	0.004	70.7	0.002	-2.3	1.000
53	LC-MS+	LisoFE(P-16:0)	438.2983	437.2904	20.96	12.8	0.792	53.3	0.002	49.9	0.005	35.9	0.052	32.8	0.093	-2.2	0.852
54	LC-MS+	LisoFE(P-18:0)/ LisoFE (O-18:1)	466.3299	465.3239	25.28	1.3	0.792	59.8	0.004	46.9	0.005	57.8	0.009	45.1	0.006	-8.0	0.414
55	LC-MS-	LisoFS(18:0)*	524.2981	525.3077	27.15	6.1	0.662	76.8	0.041	86.5	0.020	66.7	0.030	75.8	0.045	5.5	0.573
56	GC-MS	Metil-beta-D- galactopiranosido	—	217.0	16.88	0.6	1.000	-30.8	0.180	11.8	0.950	-31.2	0.052	11.1	1.000	61.5	0.029
57	GC-MS	Mio-inositol	—	217.0	19.26	21.7	0.030	22.6	0.394	-0.8	0.755	0.7	0.931	-18.5	0.222	-19.1	0.414
58	GC-MS	Ác. Mirístico	—	285.0	16.88	-28.4	0.082	-40.1	0.041	-27.3	0.043	-16.2	0.329	1.6	0.943	21.3	0.181
59	GC-MS	Ác. Oleico	—	117.0	20.44	-40.0	0.247	-40.9	0.589	-2.1	0.950	-1.6	0.930	63.0	0.127	65.7	0.043
60	GC-MS	Ác. Oxálico	—	147.1	7.96	-17.3	0.429	23.3	0.485	-0.9	0.950	49.1	0.429	19.9	0.001	-19.6	0.852
61	GC-MS	Ác. Palmítico	—	117.0	18.85	-31.1	0.177	-24.0	0.699	2.0	0.755	10.4	0.429	48.2	0.045	34.3	0.043
62	GC-MS	Fenilalanina	—	218.1	14.41	93.8	0.017	21.5	0.818	20.7	0.852	-37.3	0.017	-37.7	0.003	-0.6	0.950
63	GC-MS	Ác. Pirúvico	—	174.1	6.64	103.4	0.052	-10.2	0.818	-31.7	0.142	-55.9	0.035	-66.4	0.003	-23.9	0.228
64	GC-MS	Serina	—	116.1	9.65	-41.5	0.052	-6.3	0.818	-5.6	0.852	60.1	0.030	61.3	0.093	0.7	1.000

65	LC-MS-	Esfinganina-1-fosfato*	380.257	381.2643	16.59	33.9	0.177	32.4	0.132	41.2	0.020	-1.2	0.931	5.4	0.354	6.7	0.491
66	LC-MS+	Esfingosina*	300.2893	299.2801	15.22	103.4	0.052	106.4	0.026	78.3	0.005	1.5	0.931	-12.4	0.622	-13.6	0.950
67	LC-MS-	Esfingosina-fosfato oxidada (No descrita)	376.2253	377.2336	13.15	6.6	0.537	5.9	0.589	20.5	0.029	-0.6	0.792	13.1	0.171	13.8	0.282
68	LC-MS-	Esfingosina-1-fosfato*	378.2409	379.2489	15.69	11.8	0.662	16.4	0.310	33.0	0.013	4.2	0.662	19.0	0.284	14.2	0.228
69	GC-MS	Tagatosa	—	307.2	17.16	88.4	0.792	-21.6	0.180	-33.3	0.020	-58.4	0.247	-64.6	0.065	-15.0	0.414
70	GC-MS	Ác.Trihidroxibutírico	—	292.0	13.58	-61.2	0.004	-22.0	0.485	-43.7	0.020	100.9	0.017	45.0	0.045	-27.8	0.108
71	LC-MS+	Desconocido, con estructura similar a un esfingolípido	304.2997	303.2922	15.61	34.8	0.429	-29.3	0.180	-47.6	0.020	-47.5	0.052	-61.1	0.006	-25.9	0.228
72	GC-MS	Urea	—	189.1	9.43	2.9	0.931	19.7	0.394	37.0	0.132	16.3	0.329	33.2	0.040	14.5	0.266
73	GC-MS	Valina	—	144.1	9.04	111.6	0.030	37.8	0.394	36.0	0.414	-34.9	0.017	-35.7	0.030	-1.3	0.950
74	LC-MS+	Xestoaminol C	230.2475	229.2400	10.20	-60.4	0.052	23.1	0.485	-71.9	0.001	210.6	0.931	-29.0	0.435	-77.1	0.573
Número de metabolitos significativos						12		17		32		29		49		9	

NOTA: * Identificación confirmada con estándar comercial. Las celdas con un *p* valor de la U-Mann Whitney inferior a 0.05 se resaltan en rojo. El porcentaje de cambio fue coloreado en rojo para el incremento positivo y en azul para la disminución. Metabolitos significativos de “no alérgicos vs. leves” n = 12; Metabolitos significativos de “no alérgicos vs. moderados” n = 17; Metabolitos significativos de “no alérgicos vs. graves” n = 32; Metabolitos significativos de “leves vs. moderados” n = 29; Metabolitos significativos de “leves vs. graves” n = 49; Metabolitos significativos de “moderados vs. graves” n = 9.

Resultados Proteómica

Optimización del protocolo para la determinación de los isotipos de anticuerpos específicos de alérgeno.

Como punto de partida, ALK (Hørsholm, Dinamarca) proporcionó un protocolo para la purificación de anticuerpos específicos para alérgenos. En este protocolo, los anticuerpos específicos de alérgenos en las muestras de suero se enriquecen uniéndose a alérgenos conjugados con biotina y se capturan con perlas magnéticas. Luego, los eluatos de proteínas se digieren a péptidos y se marcan con reactivos de TMT. Los péptidos marcados se analizan posteriormente con LC-MS/MS. Este protocolo fue desarrollado utilizando Der p 2, un alérgeno mayoritario de los ácaros del polvo doméstico (HDM). Las limitaciones de esta metodología fueron: primero, la incertidumbre de la purificación completa de los anticuerpos alérgénicos específicos. En segundo lugar, algunas proteínas produjeron uniones inespecíficas, generando ruido en el tratamiento de datos. En tercer lugar, como el método se desarrolló utilizando solo Der p 2, no se sabía si era extensible a otros alérgenos. Finalmente, aunque se demostró el éxito de la reacción con TMT, no estaba claro si todos los péptidos estaban reaccionando. Por lo tanto, la optimización de este método se realizó para superar todas estas limitaciones.

Para lograr esta optimización, se incluyeron más alérgenos: Phl p 1, Phl p 5 y Phl p 6, así como Der p 2, como se puede ver en la figura 26a en un gel de electroforesis. Decidimos usar Der p 2, Phl p 1 y Phl p 5, ya que son los alérgenos mayoritarios en HDM y alergia al polen de gramíneas, respectivamente. Estos tres se miden comúnmente en pruebas de diagnóstico, ya que sus niveles de IgE específica en sangre son los más altos. Por otro lado, Phl p 6 no es un alérgeno importante, pero se seleccionó para probar si la metodología era capaz de purificar anticuerpos específicos contra alérgenos en concentraciones más bajas. También se decidió utilizar un extracto de Phl p X (formado por la mezcla de Phl p 1, Phl p 5 y Phl p 6), para probar la capacidad de separar los anticuerpos específicos de los diferentes alérgenos en una mezcla.

Estos alérgenos se probaron utilizando el protocolo inicial. Posteriormente, se confirmó la unión completa de todos los alérgenos biotinilados a las perlas de estreptavidina con un gel de electroforesis teñido con plata como se puede ver en la figura 26b.

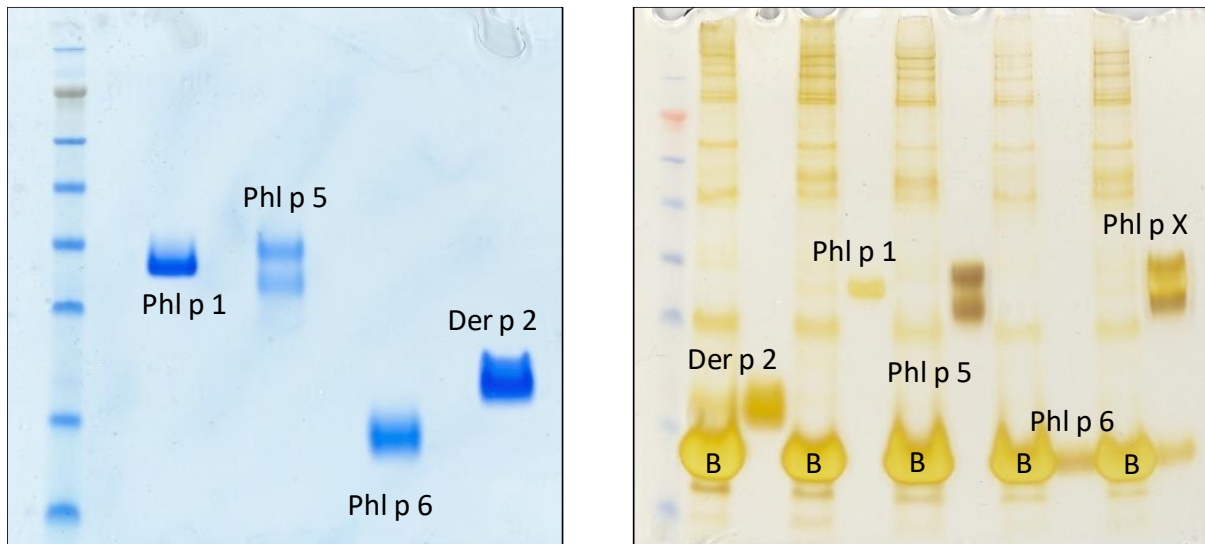


Figura 26. Geles de electroforesis de los alérgenos biotinilados utilizados durante la optimización del protocolo: Phl p 1, Phl p 5, Phl p 6, Der p 2; **a)** Los alérgenos sin las perlas **b)** Gel teñido con plata de los alérgenos (incluyendo Phl p X) con 50 μ l de perlas de estreptavidina (B) en la etapa de incubación.

Para probar la selectividad del protocolo, se utilizó una muestra de suero de un paciente alérgico solo a HDM y solo al polen de gramíneas. Después de la aplicación del protocolo, la muestra del paciente con alergia a HDM no presentó anticuerpos específicos contra el polen de gramíneas, y la muestra de la alergia al polen de gramíneas tampoco mostró anticuerpos específicos contra Der p 2.

Una vez que se seleccionaron los alérgenos y se probó la selectividad, se estudiaron los siguientes parámetros para la optimización del protocolo. Estos se destacan en la figura 27.

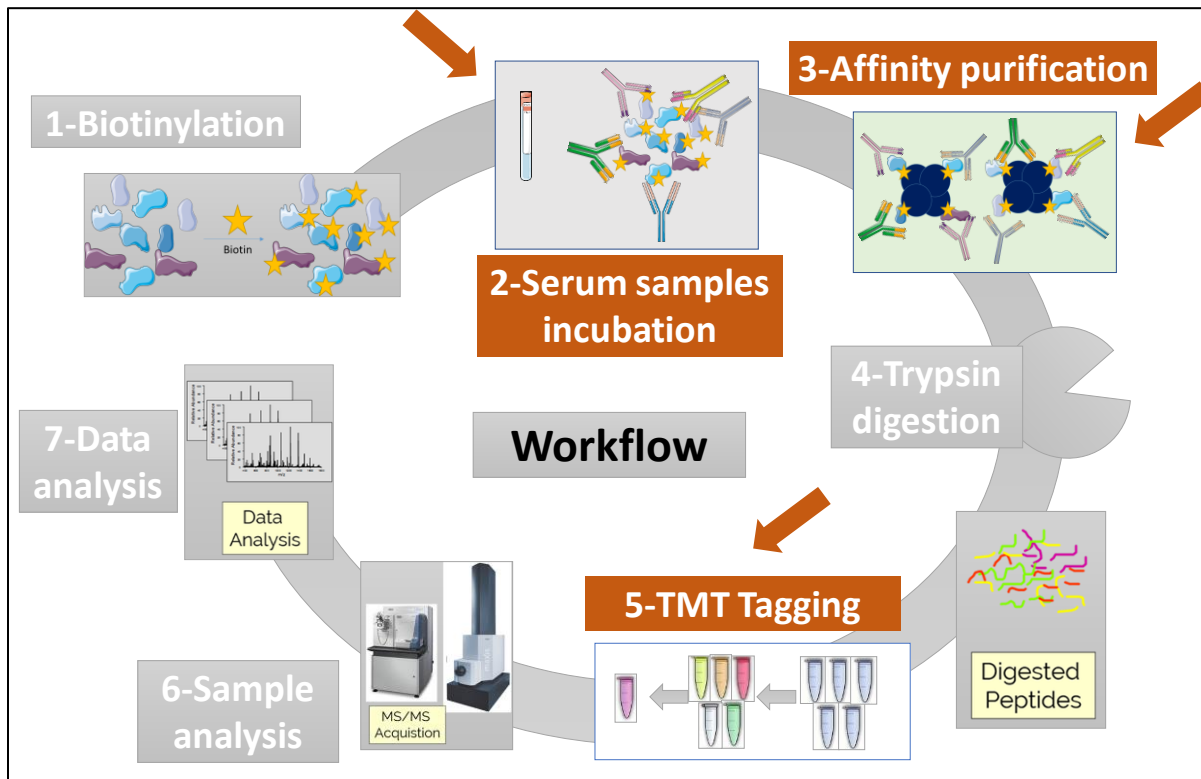


Figura 27. Principales pasos optimizados resaltados en color.

Con respecto al protocolo, los tres pasos principales que se optimizaron fueron: (1) la incubación de la muestra de suero, (2) la purificación por afinidad y (3) el marcaje con TMT.

En el caso de la incubación de las muestras de suero, se probó la cantidad de alérgeno biotinilado a utilizar para confirmar la unión completa de los alérgenos con los anticuerpos específicos. Para este propósito, se probaron 1 μg , 1,5 μg y 2 μg de alérgeno biotinilado. Los anticuerpos específicos se midieron por LC-MS/MS, y con 2 μg de alérgeno biotinilado, se obtuvieron puntuaciones más altas para los péptidos de anticuerpos específicos (datos no mostrados).

Una segunda prueba en el paso de "incubación de muestras de suero" fue la optimización de la cantidad de perlas de estreptavidina que se utilizarán en dos pasos: en la preincubación y en la incubación del suero. Las perlas en la etapa de preincubación son necesarias para extraer las uniones inespecíficas del suero, mientras que las perlas en la etapa de incubación se usan para las proteínas específicas. Las cantidades de perlas probadas para ambos pasos fueron 25, 50 y 100 μ l. Para el análisis de la etapa de preincubación, las perlas de estas muestras se digirieron directamente en péptidos y se analizaron por LC-MS/MS. Los resultados mostraron que la cantidad de enlaces inespecíficos fue la misma independientemente de la cantidad de perlas. Por lo tanto, se eligió la cantidad mínima de perlas para la etapa de preincubación (25 μ l). En el caso de la etapa de incubación, se observó que con 50 μ l de perlas era suficiente para asegurar la unión completa de todos los alérgenos biotinilados. Esto se muestra en la figura 26b.

Además, también probamos el tipo de perlas: de estreptavidina o magnéticas que se utilizarán en el protocolo. La figura 28a-b muestra la señal relativa de una de las proteínas más abundantes en el suero, que se une inespecíficamente a las perlas con los alérgenos biotinilados. Como se puede observar, las perlas magnéticas en la figura 28b presentan uniones menos inespecíficas y, por lo tanto, se fueron las seleccionadas.

Con respecto a la etapa de "purificación por afinidad", se probó un paso de lavado adicional después de la incubación del suero. La figura 28c muestra la señal relativa de la proteína de unión inespecífica añadiendo la etapa de lavado adicional. El resultado demostró una disminución de la abundancia relativa en comparación con la que no tiene un paso de lavado adicional (figura 28b) y debido a eso, el paso de lavado adicional se incorporó al protocolo.

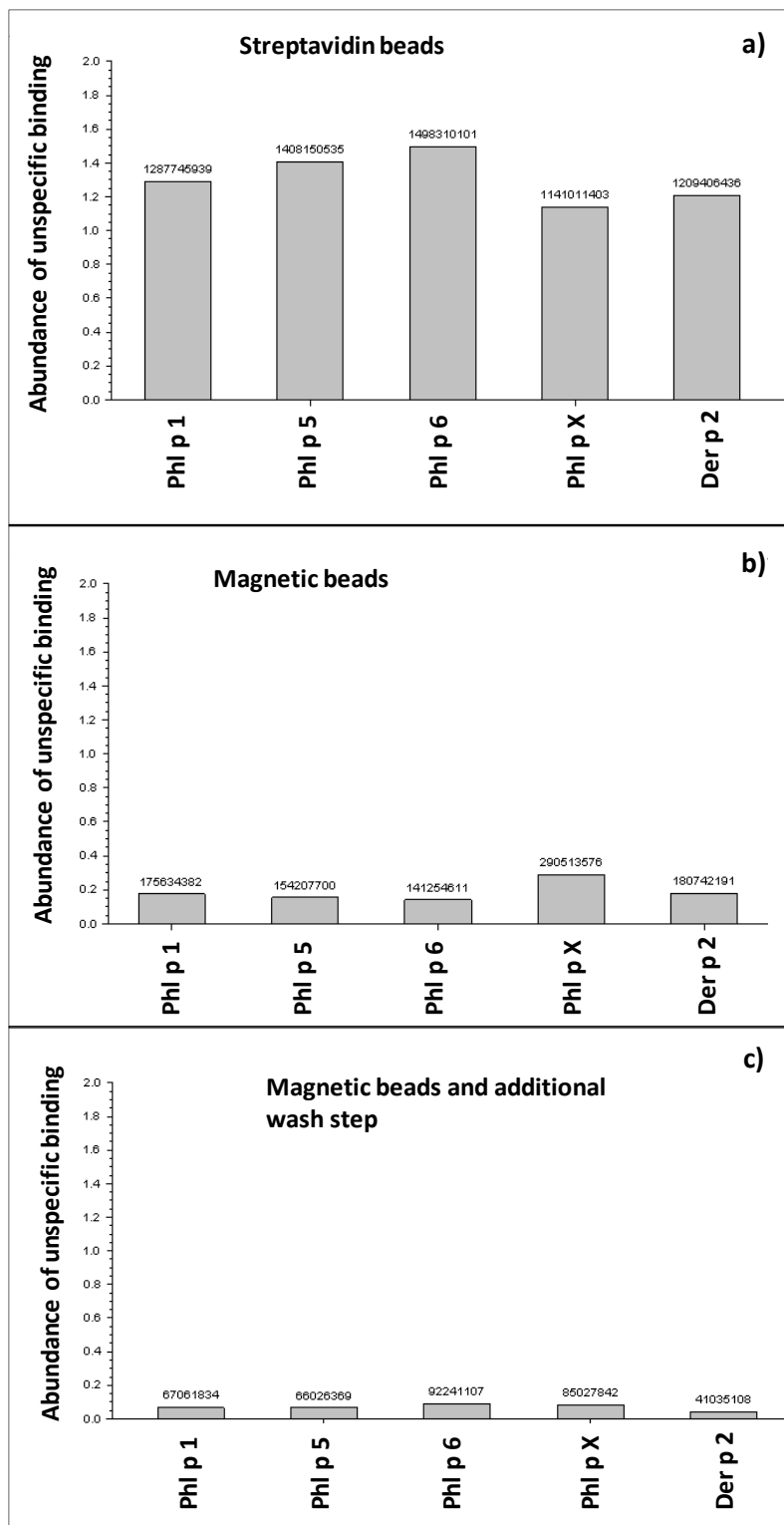


Figura 28. Resultados de la señal relativa de una de las proteínas más abundantes en el suero, que se une inespecíficamente a las perlas con los alérgenos biotinilados en

diferentes condiciones para la optimización del protocolo: **a)** utilizando perlas de estreptavidina; **b)** utilizando perlas magnéticas; **c)** utilizando perlas magnéticas y el paso de lavado adicional.

Finalmente, en la etapa de "marcaje con TMT", se usó el kit comercial de reactivos de marcajes isobáricos TMT10plex™ (10plex) aplicando las especificaciones del fabricante. Los reactivos 10plex son isótopos determinados, que se unen a los péptidos. De esta manera, permiten la semicuantificación de los péptidos en cada muestra individual. Por lo tanto, para asegurar el marcaje completo de los péptidos, se probó la utilización del doble del volumen de reactivos 10plex de las especificaciones. Los resultados mostraron puntuaciones más altas de los péptidos específicos, y debido a eso, se implementó el volumen doble de reactivos de 10plex.

En resumen, se eligieron 2 µg de alérgenos biotinilados y 25 µl de perlas magnéticas para la preincubación y 50 µl para la incubación del suero. Además, se implementó una etapa de lavado adicional y un volumen doble de reactivos 10plex en el protocolo.

Aplicación del método en las muestras de ensayos clínicos.

Con respecto a la aplicación del protocolo optimizado a las muestras clínicas de pacientes con alergia al polen de gramíneas, solo se utilizaron Phl p 1 y Phl p 5, ya que son los principales alérgenos del polen de gramíneas. En este proyecto, las muestras clínicas consistieron en ocho pacientes, cada uno con 7 visitas durante inmunoterapia, la mitad de ellos con tratamiento SLIT o SCIT, lo que resultó en un n = 56 como número total de muestras. La optimización de este protocolo permitió medir y cuantificar los diferentes isotipos de anticuerpos específicos de los 7 puntos de tiempo diferentes en un solo tubo y en una sola medición. El experimento se analizó en ciego sin conocer el tratamiento de los pacientes. Además, cada muestra se analizó dos veces en LC-MS/MS para evaluar la variabilidad analítica.

Desafortunadamente, una de las muestras del tratamiento SCIT no pasó el control de calidad, ya que las señales correspondientes a la mitad de los péptidos marcados estaban cerca de la línea base. Por lo tanto, esta muestra fue retirada del estudio.

Después del análisis de todas las muestras por LC-MS/MS, se obtuvo la cuantificación de IgE e IgG4 específicas. El número de veces de cambio o fold change (FC) se calculó utilizando la visita antes de comenzar el tratamiento, como línea base para cada paciente. Estos FC se representaron durante los tratamientos en un gráfico como se puede ver en la figura 29 para IgE e IgG4, respectivamente. En esta figura, el tratamiento con SLIT para la mitad de los pacientes induce un incremento de IgE específica después de 1 mes de tratamiento en comparación con el tratamiento con SCIT. Además, la IgG4 específica de Phl p 1 y Phl p 5 aumenta para ambos tipos de tratamiento con una respuesta ligeramente mayor para el tratamiento con SCIT.

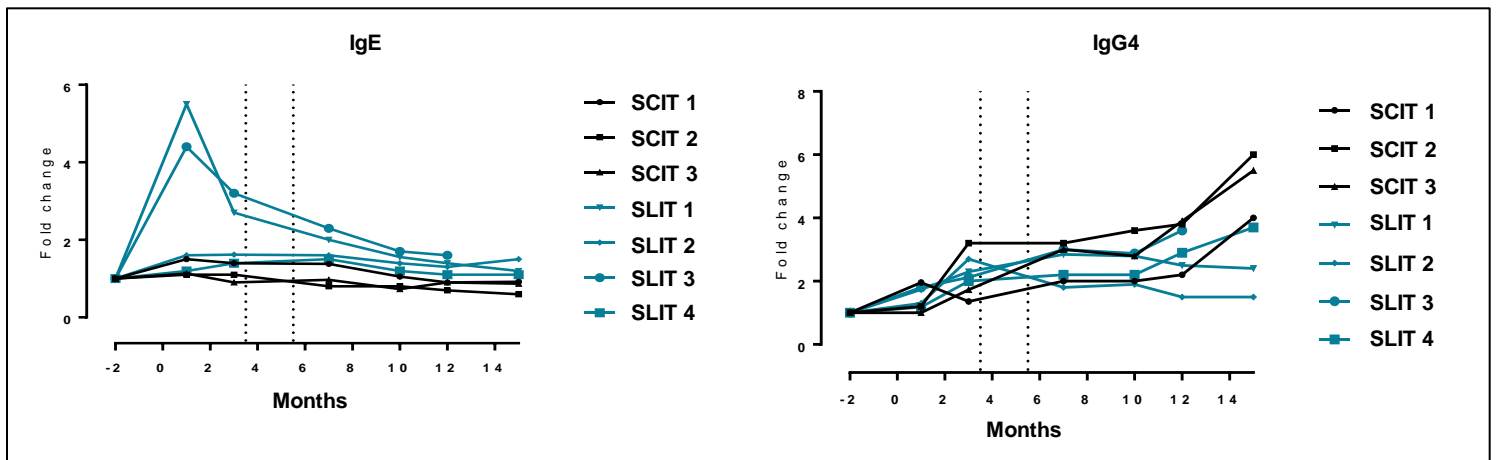


Figura 29. FC de IgE e IgG4 específicas para Phl p 1 y Phl p 5 de pacientes durante la inmunoterapia con SLIT o SCIT por LC-MS/MS.

Complementario al protocolo optimizado por LC-MS/MS, se aplicó por parte de la empresa ALK el procedimiento por immunoCAP, que es un método estándar que semicuantifica anticuerpos específicos de diferentes alérgenos en muestras independientes. De la misma manera que antes, se realizó el cálculo del FC para cada paciente. Sus FC se representaron en un gráfico durante los tratamientos para IgE e IgG4, respectivamente (Figura 30). Los resultados de immunoCAP mostraron las mismas tendencias que el método optimizado de LC-MS/MS.

En resumen, el protocolo optimizado por LC-MS/MS se aplicó con éxito a muestras clínicas de pacientes alérgicos al polen de gramíneas durante los tratamientos con SLIT o SCIT. Los resultados de esta nueva metodología concuerdan con los resultados obtenidos mediante el método estándar de immunoCAP.

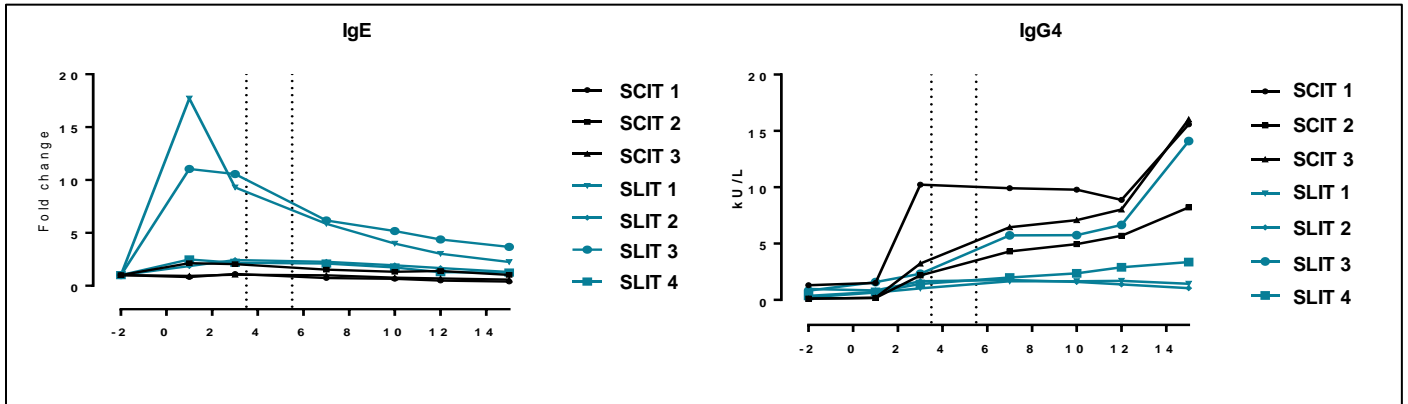


Figura 30. FC de IgE e IgG4 específicas para Phl p 1 y Phl p 5 de pacientes durante la inmunoterapia SLIT o SCIT por immunoCAP.

Discusión

Encontrar un modelo clínico adecuado de progresión de la enfermedad alérgica no es tarea fácil, particularmente la identificación de fenotipos alérgicos graves y homogéneos, que son críticos para entender la evolución de la alergia. Hemos aprovechado el modelo único que representan estos pacientes alérgicos al polen de gramíneas, residentes en áreas de alta exposición al polen que desarrollan reacciones graves alérgicas a la medicación mediadas por profilina. Estas reacciones caracterizan a un grupo de pacientes con un fenotipo alérgico grave que aparentemente pierde tolerancia al alérgeno.

El objetivo de este trabajo fue identificar los biomarcadores potenciales y comprender las causas subyacentes de la progresión a fenotipos graves. Utilizamos un enfoque de metabolómica, utilizando dos técnicas complementarias como son GC-MS y LC-MS, y generamos un modelo para mejorar la clasificación de algunos pacientes.

Estudios previos han demostrado que el uso de algoritmos matemáticos basados en parámetros objetivos, como perfiles de transcriptómica, son útiles para mejorar la clasificación clínica de los pacientes⁵³⁻⁵⁵. En este trabajo, hemos establecido una clasificación basada en el perfil metabólico de los pacientes. En primer lugar, incluimos sujetos no alérgicos e identificamos fenotipos alérgicos graves por su historia clínica y su respuesta al test de provocación oral con profilina pura. Al utilizar estos dos fenotipos extremos, obtuvimos un algoritmo matemático que se utilizó para refinar la clasificación clínica de los "pacientes no graves alérgicos a profilina". Es importante señalar que este fenotipo no pudo clasificarse correctamente en función de la provocación oral, ya que muchas veces se detuvo el procedimiento de provocación debido a las intensas reacciones locales⁵⁶. Esta nueva clasificación representa una herramienta potencial para la estratificación de pacientes que debe validarse en estudios posteriores y está en consonancia con los enfoques actuales para comprender los fenotipos de las enfermedades⁵³⁻⁵⁵.

Al utilizar este sistema para mejorar la clasificación, pudimos dividir al grupo "pacientes no graves alérgicos a profilina" en tres grupos. El primero, con un perfil más cercano al grupo "no alérgicos", se denominó "leves", el segundo, con un perfil más cercano al grupo de "graves", se introdujo en el grupo "graves" y el resto se introdujo en un grupo llamado "moderados". Esto nos permitió analizar la evolución de la inflamación alérgica. De manera interesante e inesperada, todos los pacientes que se clasificaron clínicamente como graves compartieron perfiles metabólicos y transcriptómicos comunes, confirmando así la correlación entre la clasificación clínica y la metabolómica, validando el modelo clínico utilizado.

Posteriormente, realizamos un análisis estadístico de los datos de las muestras de metabolómica para encontrar firmas específicas, con el fin de identificar posibles biomarcadores candidatos y rutas biológicas asociadas con la adquisición de un fenotipo grave. Las diferentes abundancias de los metabolitos proporcionaron una visión global de los procesos biológicos asociados a la evolución de la inflamación.

En primer lugar, se observaron cambios muy marcados en el metabolismo energético. Hay un consumo alterado de glucosa y otros azúcares, que se metabolizan a lactato en presencia de oxígeno. De forma basal, las células destinan la mayor parte del piruvato para la obtención de energía en la mitocondria debido a que en esta se produce mayor rendimiento energético que la conversión de piruvato a lactato en presencia de oxígeno. Por el contrario, la conversión de piruvato a lactato se realiza más rápidamente que la obtención de energía en la mitocondria, por lo que es una manera más rápida pero menos eficiente de obtener energía en presencia de oxígeno.

De acuerdo con nuestros resultados, los estudios existentes basados en ómicas han permitido determinar que las células inmunes cambian su metabolismo cuando proliferan

para hacer frente a la creciente demanda resultante de la necesidad de sintetizar precursores biológicos y diferentes mediadores, como los descritos en la introducción, que actúan y participando o regulando procesos inmunitarios o procesos inflamatorios⁵⁷.

La utilización de piruvato para transformarlo en lactato mayoritariamente en vez de realizar la glucólisis, se conoce como "glucólisis aeróbica" o "metabolismo de Warburg"⁵⁸ (Figura 17) y fue descrito por primera vez por Warburg en células cancerosas^{59,60}. También este efecto ha sido descrito en células T en el caso de asma e inflamación ya que las células T activadas proliferan⁶¹ y necesitan obtener energía rápidamente, de forma análoga a las células tumorales⁶²⁻⁶⁴.

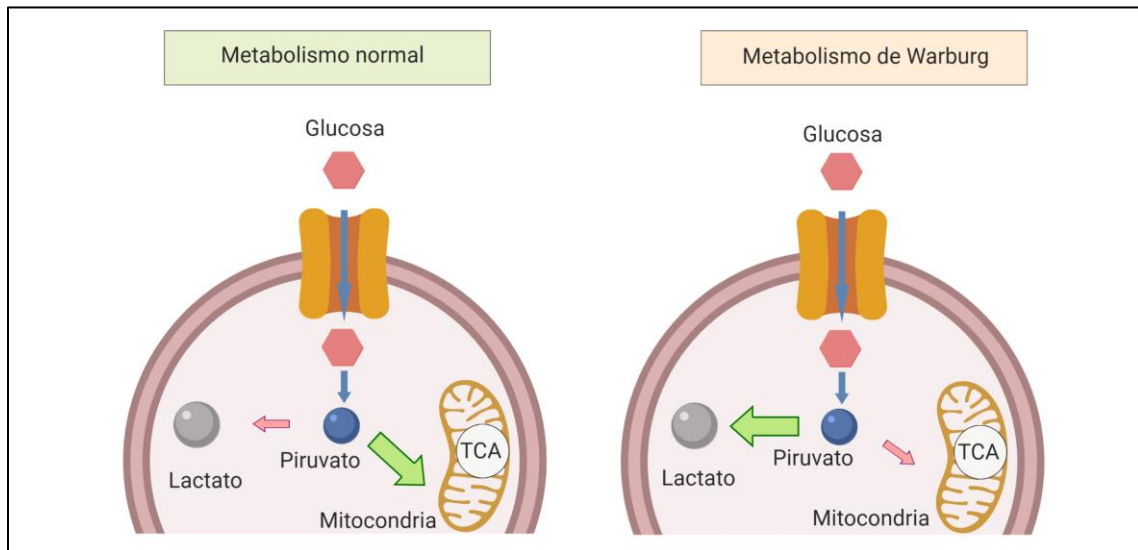


Figura 17: Representación esquemática del metabolismo de Warburg; en condiciones normales, como se muestra en la imagen de la izquierda, la mayor parte del flujo de la glucólisis se canaliza hacia el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), mientras que en el caso del metabolismo de Warburg, como se muestra en la imagen de la derecha, la mayor parte del flujo se canaliza hacia la síntesis de lactato, lo que supone una vida más rápida de obtención de energía pero menos eficiente en presencia de oxígeno.

Al analizar el metabolismo de lípidos, se observó un aumento progresivo de algunos ácidos grasos (ácidos oleico y palmítico) entre los fenotipos alérgicos, el incremento de palmítico además ha sido asociado con el riesgo en asma por medio de un mayor consumo en la dieta⁶⁵. Mientras que, otros ácidos grasos (ácidos mirístico y láurico) están solo aumentados en el grupo grave en comparación con los fenotipos alérgicos intermedios. El aumento de ácido mirístico, al igual que el ácido palmítico, por medio de un mayor consumo en la dieta ha sido también fuertemente asociado con el riesgo en asma^{65,66}.

Observamos también una reducción de las carnitinas (L-carnitina, acetilcarnitina y hexanoilcarnitina) en el grupo "grave" en comparación con el "leve". La carnitina es una molécula que se encarga de transportar ácidos grasos de cadena media (de 10 a 20 carbonos), que necesitan ser activados en la membrana externa mitocondrial. Los ácidos grasos de cadena corta (menos de 10 carbonos) entran directamente a la mitocondria mientras que los ácidos grasos de cadena larga (de más de 20 carbonos) van a los peroxisomas, donde se oxidan para acortar sus cadenas para una posterior β -oxidación mitocondrial.

El proceso por el cual la carnitina funciona de transportador en la membrana mitocondrial es el siguiente: en la activación de los ácidos grasos se obtienen moléculas llamadas acil-CoA (Coenzima A), pero el CoA impide su paso a través de la membrana interna mitocondrial por lo que necesitan un mecanismo especial de transporte a través de dicha membrana. El grupo acilo se transfiere a la carnitina para formar la acilcarnitina. La acilcarnitina actúa entonces como una lanzadera a través de la membrana interna mitocondrial por acción de una translocasa. El grupo acilo se transfiere entonces a una molécula de CoA situada en la cara matricial de esta membrana. Por último, la carnitina se devuelve al lado citosólico por la acción de la translocasa donde se intercambia por otra acilcarnitina que entra (figura 18).

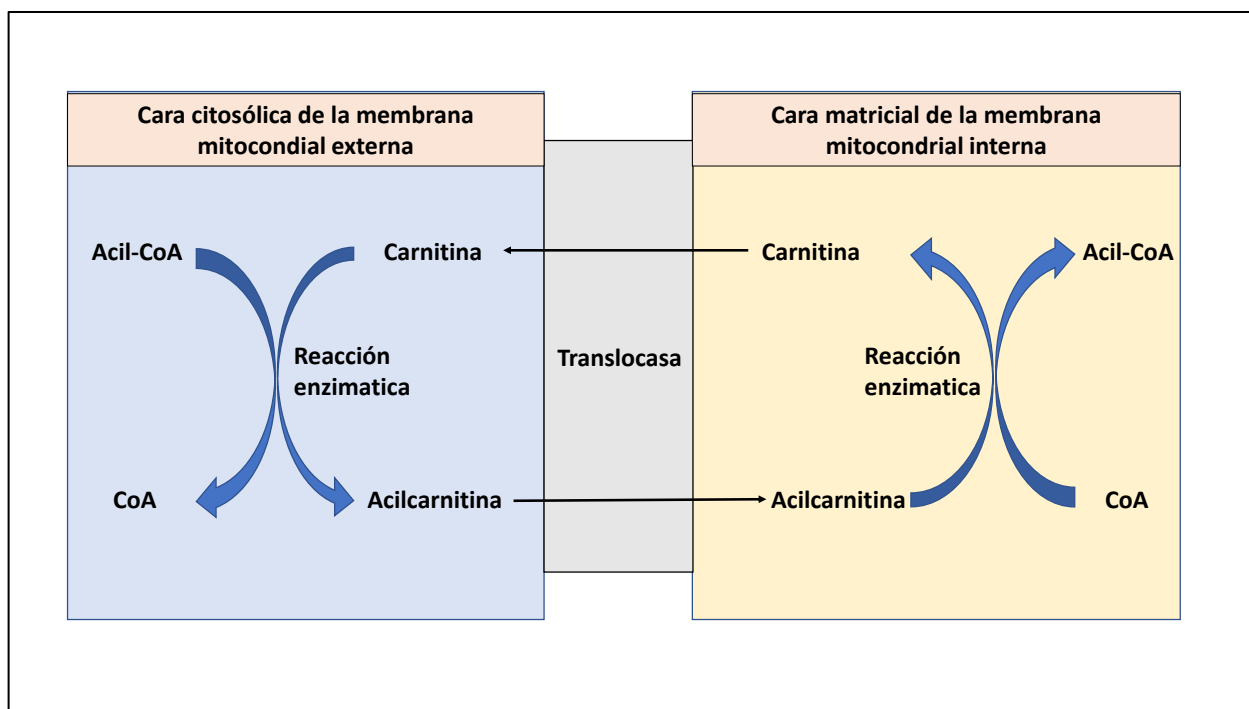


Figura 18. Papel de la carnitina en la membrana mitocondrial.

Además del posible descenso de carnitinas asociado al desvío energético hacia la glucólisis aerobia, otra posible explicación de esta disminución en el fenotipo grave es que estos ácidos grasos se estén utilizando para la síntesis de mediadores inflamatorios^{67,68}.

En consonancia con esta hipótesis, se ha podido observar un aumento de diferentes LFC en los grupos más graves, que puede explicarse por la utilización de fosfolípidos como precursores inflamatorios mediante la acción de enzimas específicas como la lipasa A2.

Quizás, la firma metabolómica más interesante está relacionada con los esfingolípidos. Detectamos un aumento progresivo de S1P desde los fenotipos leves hasta los graves. Asociados con este hallazgo, hemos observado diferentes cambios metabólicos en otros metabolitos del grupo de los esfingolípidos. Así, por ejemplo, detectamos una

disminución de esfingosina y xenosfingolípidos en el grupo "grave". La esfingosina es un precursor de S1P, y suponemos que los xenosfingolípidos también podrían ser precursores de S1P, lo cual podría indicar estrés en las rutas biosintéticas de S1P.

Esfingosina-1-fosfato (S1P)

Con todos estos resultados, vamos a hondar un poco más en el papel y funciones de la S1P y en su relación con distintas células del sistema inmune.

En primer lugar, la S1P es un mediador clave, que ejerce multitud de efectos en diferentes tejidos a través de receptores de esfingosina-1-fosfato (S1PR) que se expresan en una amplia variedad de tejidos. Existen diferentes subtipos de receptores y cada subtipo exhibe una especificidad celular diferente. Los leucocitos presentan la mayor densidad de receptores de S1P.

Hay descritos cinco tipos de receptores de S1P. Los receptores S1PR1 (Linfocitos T y B, mastocitos, células dendríticas, endotelio, músculo cardíaco, neuronas) S1PR2 (músculo liso vascular, endotelio, tejido cardíaco, fibroblasto pulmonar, células tumorales) y S1PR3 (músculo liso vascular, endotelio, tejido cardíaco, fibroblasto pulmonar,) se expresan de forma ubicua. La expresión de S1PR4 y S1PR5 está menos extendida. S1PR4 se limita a los tejidos linfoides y hematopoyéticos, mientras que S1PR5 se encuentra principalmente en la sustancia blanca del sistema nervioso central y el bazo^{69,70}.

En las enfermedades alérgicas, la alteración de los niveles de S1P influye en la diferenciación y la capacidad de respuesta de los mastocitos. La S1P se sintetiza mediante dos esfingosina quininas (SphKs), la esfingosina quinasa 1 y la esfingosina quinasa 2. La unión de la IgE con el receptor FcεRI induce la activación de ambos SphKs y genera S1P. Además, las SphKs también son esenciales para la activación de mastocitos mediada por FcεRI. Los mastocitos activados exportan S1P al espacio

extracelular y producen una respuesta inflamatoria y la remodelación del tejido. (Figura 19). La señalización S1P tiene doble función en las respuestas alérgicas. La activación de SphKs y la secreción de S1P son necesarias para la activación de mastocitos; sin embargo, la señalización S1P juega un papel vital en la recuperación de la anafilaxia. Se ha demostrado que varios ARN no codificantes desempeñan un papel crucial en el control de las respuestas inflamatorias y alérgicas asociadas con mastocitos. Por lo tanto, la vía de señalización de S1P y su regulación por ARN no codificante podrían explorarse como una posible diana terapéutica potencial para el asma y otras enfermedades asociadas a mastocitos⁷¹.

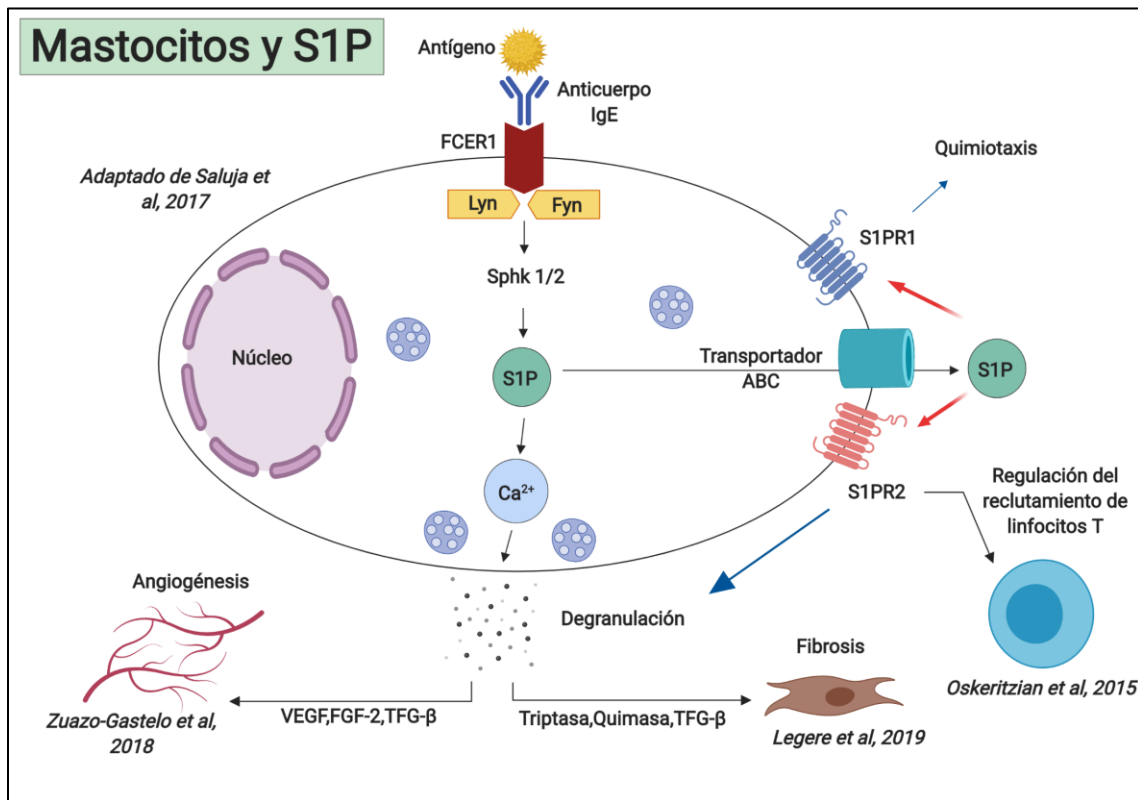


Figura 19. Esquema de la relación de S1P con los mastocitos.

En cuanto a la relación de la S1P con los linfocitos, el gradiente S1P en la interfaz tejido-vascular regula el tráfico de células inmunitarias de los órganos linfoides hacia la circulación periférica. Un análisis adicional sugiere que la fosfatasa lipídica 3 (LPP3) de

la superficie celular, que puede degradar la S1P en esfingosina, también es un importante regulador de la circulación linfocitaria. Además, el transportador de S1P, Spns2, que se expresa principalmente en las células endoteliales linfáticas, también se requiere para una salida eficiente. Las esfingosina quinasas en las células endoteliales linfáticas también son importantes^{72,73}. Estos hallazgos apoyan un modelo por el cual la captación y el metabolismo de S1P de la circulación por las células endoteliales, seguido por la secreción polarizada de S1P por Spns2 a través del gradiente puede estar involucrado en el tráfico de linfocitos. El receptor S1P1 en la superficie celular de los linfocitos es crucial para esta salida. Se ha demostrado que las funciones antagonistas de los receptores de retención (como el receptor de quimiocinas CCR7) y los receptores que promueven la salida (S1PR1) determinan los patrones de migración generales de las células hematopoyéticas. Por lo tanto, el antagonismo de los gradientes de quimiocinas (con las que tienden a depositarse en los tejidos) con el gradiente de S1P (con S1P enriquecida en el compartimento vascular) puede ser un fenómeno general para regular el tráfico de células hematopoyéticas dentro y fuera del sistema vascular cerrado de los vertebrados⁷⁴.

La S1P está presente en altas concentraciones en la sangre, pero se encuentra en bajas concentraciones en el parénquima del tejido linfoide (Figura 20). En las LN, la S1P que provoca la salida se secreta a partir de células endoteliales linfáticas a través del transportador SPNS2 y guía la emigración de forma dependiente del gradiente⁷⁵. Aunque S1P se ha asociado con la supervivencia celular y la supresión de la apoptosis en otros tipos de células su función en la inmunidad hasta ahora se ha limitado conceptualmente a este control del tráfico de linfocitos⁷⁶.

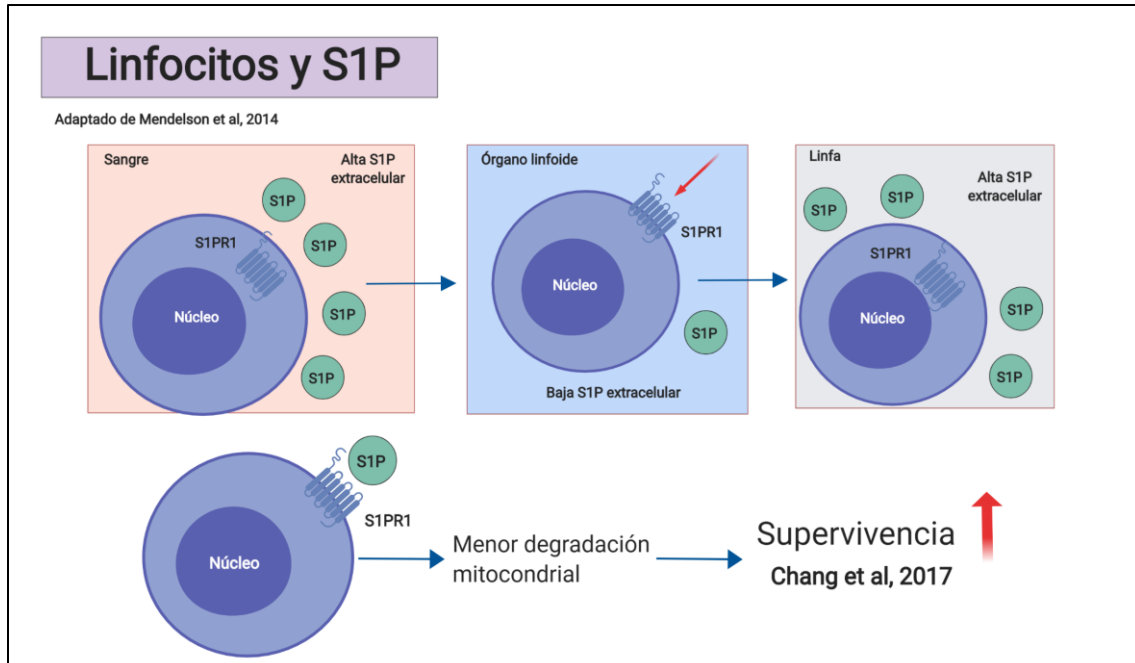


Figura 20. Control mediado por S1P del tráfico celular dentro y fuera del sistema vascular.

Por otro lado, las células que más S1P liberan a la sangre son los eritrocitos o células rojas de la sangre y las plaquetas, aunque no se sabe todavía cuál de las dos aporta más⁷⁷ (Figura 21).

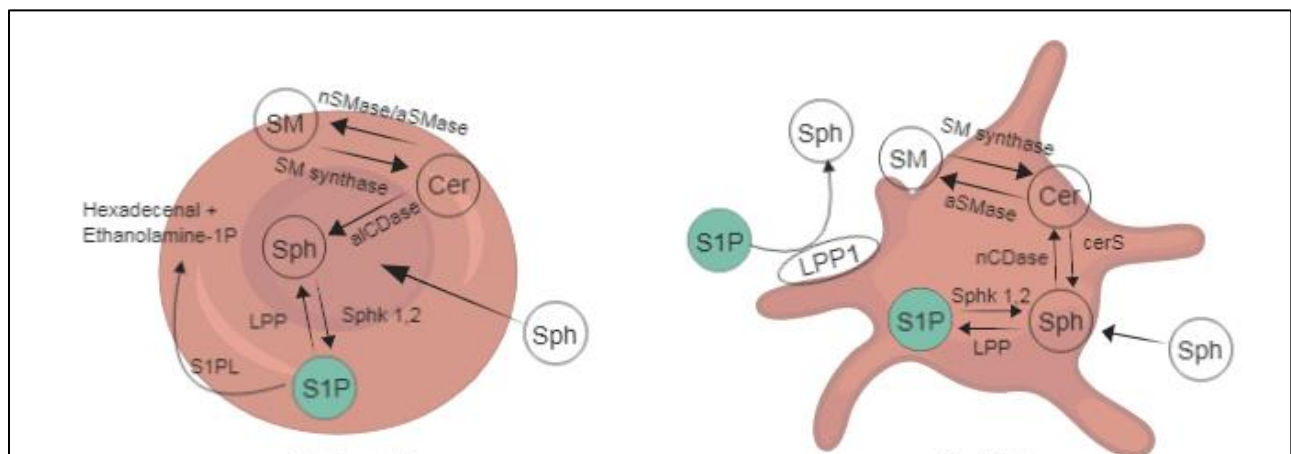


Figura 21. Esquema de las principales células productoras de S1P Y los mecanismos utilizados para ello.

Otro punto importante, es describir sus diferentes rutas de síntesis⁷⁸. La S1P es un producto del metabolismo de la ceramida, que puede originarse por tres rutas como se puede apreciar en la Figura 22. Estas rutas son las siguientes:

1. Ruta de reciclaje; catabolismo de la esfingomielina en la membrana plasmática.
2. Ruta de salvamento en el lisosoma.
3. Biosíntesis “*de novo*” en la membrana del retículo endoplásmico (ER).

En la ruta 1, catabolismo de la esfingomielina en la membrana plasmática, la esfingomielinasa (SMase) cataboliza la esfingomielina (SM) en ceramida, que se transforma en esfingosina (Sph) por la ceramidasa y finalmente se fosforila por SPHK-1/2 para formar S1P.

En la ruta 2, la vía de salvamento en el lisosoma, implica primero la descomposición de SM y esfingolípidos (SL) complejos en ceramida y luego esfingosina en el compartimento endolisosomal.

En la ruta 3, la biosíntesis “*de novo*” se inicia con la condensación de serina y palmitoil-CoA en 3-cetosfinaganina por serin-palmitoiltransferasa (SPT). En el siguiente paso, la 3-cetosfinganina se convierte rápidamente en esfinganina por la cetodihidroesfingosina reductasa (KDHR). La dihidroceramida sintasa (dihidro-CerS) convierte la esfinganina en dihidroceramida, que se cataboliza aún más en ceramida mediante la dihidroceramida desaturasa (DES). La ceramida se puede transformar en SL de orden superior, como los glicoesfingolípidos (GSL) y SM, o se puede metabolizar en Sph y, en última instancia, en S1P.

Una vez producida, la S1P puede seguir tres caminos diferentes:

1. Desfosforilación en Sph por la fosfatasa S1P (SPP) para formar ceramida.
2. Puede ser degradada irreversiblemente por la liasa S1P.
3. Se puede transportar fuera de la célula.

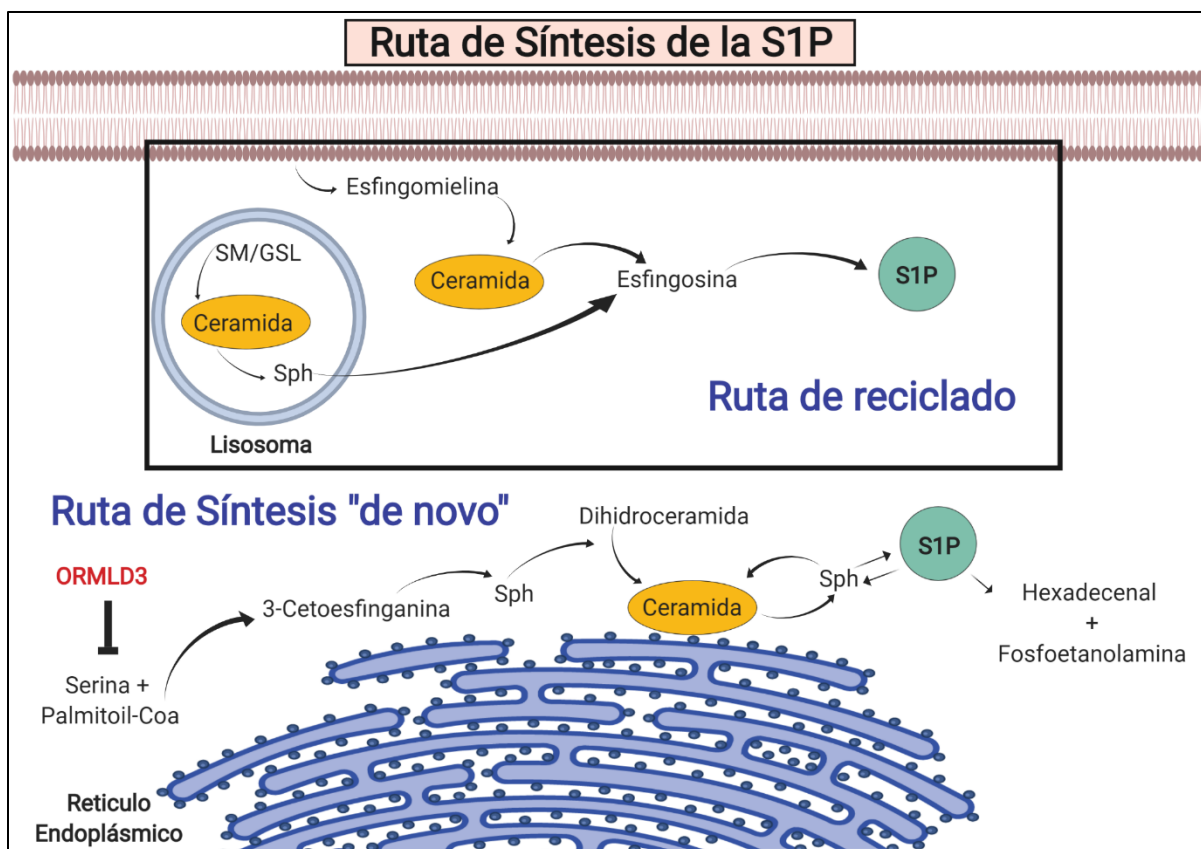


Figura 22: Esquema de las diferentes rutas de síntesis de la S1P.

Cabe destacar que existe una proteína muy ligada a la S1P y relacionada con su síntesis, es el regulador 3 de la biosíntesis de esfingolípidos ORMDL (ORMDL3), que es una proteína transmembrana localizada en el RE, implicada en la síntesis “*de novo*” de la S1P a través de la unión de serina y palmitoil-CoA. Varios polimorfismos de un solo nucleótido del locus del gen ORMDL3 se han asociado con un mayor riesgo de asma infantil y muchas enfermedades inflamatorias.

Por otro lado, existe también una relación entre los contaminantes ambientales, los mastocitos y la S1P. Los ligandos agonistas de AhR (receptor de hidrocarburos de arilo), inhiben la actividad enzimática de S1PL, que implica una interacción directa ORMDL3-S1PL y oxidación de S1PL. Estos cambios dieron como resultado un aumento de la

síntesis de S1P, que, a su vez, mejoró la respuesta de los mastocitos a través de S1PR2 de manera autocrina, como se puede observar en la figura 23. La reducción de la actividad de S1PL y el aumento de los niveles de S1P también se observaron en ratones expuestos a ligandos de AhR solos o en combinación con la exposición al antígeno. Además, se encontraron niveles elevados de S1P en plasma en niños con asma en comparación con aquellos en sujetos no asmáticos⁷⁹.

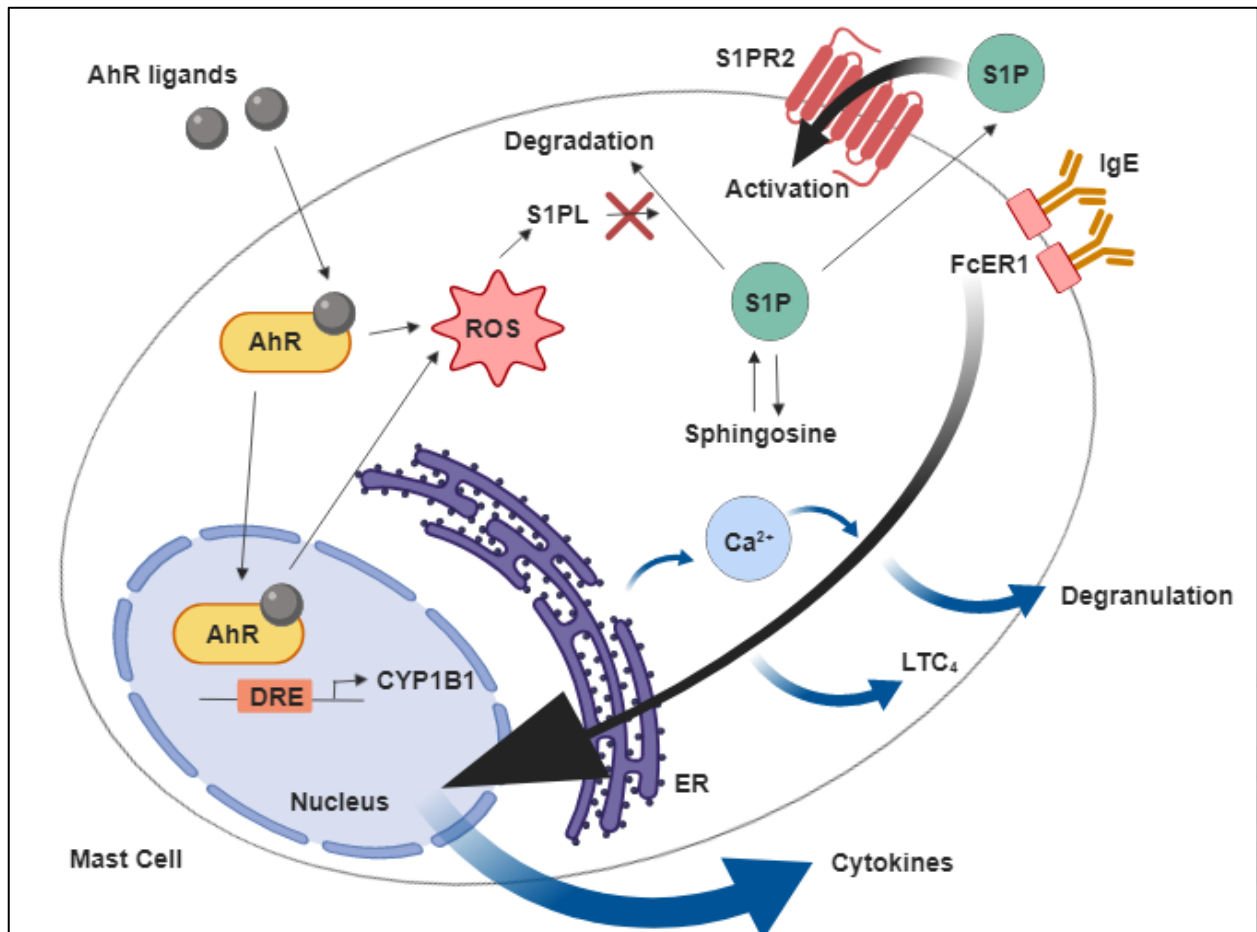


Figura 23. Esquema de la relación entre las sustancias ambientales y los mastocitos.

Recientemente y en consonancia con nuestros hallazgos, están saliendo al mercado nuevos fármacos dirigidos a otras dianas terapéuticas diferentes de las clásicas. El

fingolimod es un claro ejemplo de ello. Este fármaco es un análogo de la esfingosina, molécula precursora de la S1P y altamente implicada en procesos de inflamación como se ha mencionado anteriormente. Produce su efecto a través de los receptores de S1P, este análogo de esfingosina produce una retención rápida, selectiva y reversible de los linfocitos dentro de los ganglios linfáticos, produciendo consecuentemente una menor invasión de linfocitos autorreactivos al sistema nervioso central, y, por lo tanto, daño inflamatorio⁸⁰. Diferentes estudios han demostrado que la S1P tiene un papel en la inflamación y que las plaquetas activadas pueden producirlas, como hemos mencionado antes, almacenarlas y liberarlas mediante un transportador ABC⁸¹⁻⁸⁴. Además, la S1P puede ser degradada por el receptor de la superficie externa de las plaquetas LPP1⁷⁷.

Además, observamos un aumento a lo largo de la progresión a gravedad de los diferentes tipos de LFL (LFC, LFS y LFE), como otros autores han descrito previamente en el asma y otras patologías inflamatorias^{36,85,86}. Estos lisofosfolípidos y los precursores de ARA, que también aumentaron en pacientes "graves", participan en la activación de las plaquetas en entornos inflamatorios⁸⁷.

Hay que mencionar que este trabajo es parte de una caracterización completa de este fenotipo, donde se ha estudiado la histología de la mucosa oral de los pacientes, el perfil transcriptómico y el metabolómico para obtener una visión integrada que pueda explicar los mecanismos alterados en este tipo de pacientes.

Los resultados de transcriptómica de este estudio demuestran que diversos genes relacionados con multitud de funciones de las plaquetas están disminuidos y que apuntan a que las plaquetas pueden estar relacionadas en el desarrollo de los fenotipos graves.

Este trabajo ha sido el primero en caracterizar metabólicamente los pacientes alérgicos y sobre todo aquellos con un fenotipo grave. Estos hallazgos abren la posibilidad de

considerar nuevas estrategias de intervención orientadas a la estabilización de los sistemas de inflamación/reparación, por ejemplo, mediante el uso de intervenciones basadas en suplementos para reponer los precursores metabólicos que son altamente consumidos. El metabolismo energético alterado también podría constituir un objetivo farmacológico.

Sin embargo, estos descubrimientos tienen que ser validados en muestras nuevas utilizando una metodología dirigida. Pudiéndose así desarrollar un panel de biomarcadores que puedan predecir el estado de gravedad o de inflamación alérgica de un paciente con el fin de lograr una medicina personalizada junto con los beneficios que esto supondría.

Para finalizar, el análisis metabólico en pacientes alérgicos que se han estratificado en función de su gravedad, arroja luz sobre la progresión de esta patología. Hemos descrito nuevos mecanismos, que apuntan al agotamiento de las plaquetas, un cambio al metabolismo de Warburg y una alteración del metabolismo de lisofosfolípidos y de esfingolípidos, con especial atención a la S1P, que están asociados a una inflamación alérgica grave. Más estudios en otros modelos de alergia grave, junto con estrategias de pronóstico basadas en los enfoques ómicos, permitirán una mejor comprensión de la complejidad de este tipo de patologías.

Discusión de proteómica

Hasta la fecha, la inmunoterapia es el único tratamiento que ha demostrado ser efectivo contra la alergia. Además, es un tratamiento prolongado que dura entre tres y cinco años, y, por lo tanto, es necesario el desarrollo de métodos que permitan monitorizar los cambios en la respuesta inmune.

Los métodos actuales que miden los anticuerpos específicos, como el immunoCAP, presentan algunas limitaciones, ya que el método ofrece solo mediciones

semicuantitativas, presenta un rango lineal bajo y un alto coste por ensayo. Además, el immunoCAP muestra una alta variabilidad experimental, ya que cada muestra se mide individualmente. Este problema es aún mayor cuando se comparan los resultados de diferentes laboratorios. En base a esto, se desarrolló y se optimizó una metodología cuantitativa alternativa por LC-MS/MS.

Durante la optimización, se mejoraron las etapas críticas tales como (1) la incubación de muestras de suero, (2) la purificación por afinidad y (3) el marcaje con TMT. La selección de las perlas magnéticas y la cantidad utilizada (25 μ l para la preincubación y 50 μ l para la incubación del suero), y la cantidad de alérgeno biotinilado (2 μ g) permitió la extracción completa de los anticuerpos específicos de las muestras con la mínima contaminación. Además, el paso de lavado adicional también contribuyó a minimizar la contaminación al reducir las uniones inespecíficas. Finalmente, la utilización del doble de la cantidad de reactivo de TMT aseguró la reacción completa con los péptidos de las muestras.

La optimización de estos parámetros dio como resultado una alta sensibilidad, niveles de contaminación más bajos y una mayor eficiencia en cada etapa del protocolo. Como resultado, se obtuvo un protocolo confiable para la medición de diferentes isotipos de anticuerpos específicos y estaba listo para ser aplicado en muestras clínicas.

Posteriormente, el método optimizado se aplicó a muestras de un ensayo clínico de pacientes con alergia al polen de gramíneas, que fueron sometidos a inmunoterapia SLIT o SCIT durante 12 meses. Mediante el uso de la metodología LC-MS/MS, pudimos medir en un solo tubo y una sola medición, las 7 visitas de cada paciente.

Las trayectorias de la IgE e IgG4 específicas para Phl p 1 y Phl p 5 se obtuvieron para ambos tratamientos. El tratamiento con SLIT mostró un subconjunto de pacientes con una gran respuesta inicial en la IgE específica en comparación con el tratamiento con SCIT. Estos resultados están en concordancia con un estudio previo⁵¹. Este cambio se ha relacionado con la desensibilización a los alérgenos. Además, observamos un aumento sostenido de IgG4 específica para ambos tipos de tratamiento, aunque se observó un ligero incremento en la respuesta al tratamiento con SCIT. Esta respuesta se evaluó recientemente en un ensayo clínico con pacientes alérgicos al polen de gramíneas durante 3 años de inmunoterapia más otros 2 años de seguimiento⁸⁸. Los

autores propusieron que el cambio observado en IgG4 se debió al efecto de la tolerancia a los alérgenos.

Sin embargo, los resultados obtenidos están de acuerdo con la literatura publicada, nuestro método actual se comparó con el método estándar que utilizando immunoCAP. Las trayectorias de IgE e IgG4 específicas fueron muy similares. Sin embargo, el método LC-MS/MS ofrece algunas ventajas, como que requiere una cantidad menor de suero/plasma en comparación con immunoCAP, y permite mediciones simultáneas de varios isotipos específicos de anticuerpos de alérgenos, reduciendo la variabilidad y el error.

Aunque el número de pacientes fue bajo en la aplicación del protocolo, el objetivo futuro es validar estos hallazgos utilizando una nueva cohorte más amplia de muestras.

Aunque los anticuerpos específicos medidos fueron IgE e IgG4, esta metodología es extensible a los otros isotipos de inmunoglobulinas: IgA, IgA2, IgM, IgD, IgG1, IgG2 e IgG3, y a otros tipos de alérgenos, lo que abre nuevas posibilidades para estudiar nuevos tratamientos.

Conclusiones

Este trabajo ha demostrado que encontrar modelos clínicos adecuados de progresión de la enfermedad de la alergia, en particular identificar fenotipos alérgicos graves y homogéneos, críticos para comprender la evolución de la alergia, no es una tarea fácil. Hemos aprovechado el modelo único que representan estos pacientes alérgicos al polen de gramíneas, que residen en áreas de alta exposición y que desarrollan reacciones alérgicas graves a los alimentos mediadas por profilina. Estas reacciones identifican a un grupo de pacientes con un fenotipo alérgico grave que aparentemente pierden tolerancia al alérgeno.

El objetivo principal de este trabajo ha sido identificar biomarcadores potenciales y comprender las causas subyacentes de la progresión de la gravedad, utilizando un enfoque de metabolómica y mediante la generación de un modelo para la clasificación de pacientes.

Además, se ha establecido una clasificación basada en el perfil metabólico de los pacientes. Primero, se incluyeron sujetos no alérgicos y se identificamos fenotipos alérgicos graves por su historia clínica y su respuesta a la prueba de provocación oral con profilina pura. Al utilizar estos dos fenotipos extremos, obtuvimos un algoritmo matemático que se utilizó para refinar la clasificación clínica de los "pacientes no graves alérgicos a profilina" en tres grupos. El primero, con un perfil más cercano al grupo "no alérgico", se llamó "leve", el segundo, con un perfil más cercano al grupo "grave", se introdujo en el grupo "grave", y el resto fueron incluido en un grupo llamado "moderado". Esto permitió analizar la evolución de la inflamación alérgica a lo largo de la gravedad. Sorprendentemente, todos los pacientes que fueron clasificados clínicamente como graves compartían perfiles metabólicos y transcriptómicos comunes, confirmando así la correlación entre la clasificación clínica y metabólica.

Como principales alteraciones, se encontraron cambios marcados en el metabolismo energético. Hay un consumo alterado de glucosa y otros azúcares, que se metabolizan en lactato en presencia de oxígeno. De acuerdo con nuestros resultados, los estudios existentes basados en ómicas han publicado que las células inmunes cambian su metabolismo para hacer frente a la creciente demanda resultante de la necesidad de sintetizar precursores biológicos. Esto se conoce como "glucólisis aerobia" o "metabolismo de Warburg" y se ha descrito en células cancerosas, asma e inflamación.

Analizando el metabolismo de los lípidos, observamos un aumento progresivo de algunos ácidos grasos (ácidos oleico y palmítico) entre los fenotipos alérgicos. Mientras tanto, otros ácidos disminuyeron en los fenotipos intermedios ("leve" y "moderado") pero aumentaron en el grupo "grave" (ácidos mirístico y láurico). Además, también se observó una reducción en las carnitinas en "graves" en comparación con "leves". Una explicación de estos resultados es que, en lugar del tráfico normal de ácidos grasos en las células para la β -oxidación, es probable que se estén utilizando para la síntesis de mediadores inflamatorios. Quizás, la firma metabólica más interesante está relacionada con los esfingolípidos, detectamos un aumento progresivo con la gravedad de S1P, un mediador clave que ejerce multitud de efectos en diferentes tejidos.

Estos hallazgos abren la posibilidad de considerar nuevas estrategias de intervención orientadas a la estabilización de los sistemas de inflamación/reparación, por ejemplo, mediante el uso de intervenciones basadas en suplementos para reponer los precursores metabólicos que se consumen mucho. El metabolismo energético alterado también podría constituir un objetivo farmacológico.

Con respecto a la proteómica, los resultados de la cinética de las IgE e IgG4 específicas se correlacionaron con las mediciones de immunoCAP. El método desarrollado ofrece un nuevo enfoque para medir anticuerpos específicos de alérgenos en diferentes puntos de tiempo con varias ventajas: solo requiere una pequeña cantidad de suero o plasma,

entre 100 y 200 μ l, permite mediciones simultáneas de varios isotipos de alérgenos de anticuerpos específicos, y reduce la variabilidad experimental y el error.

Aunque solo se han mostrado los resultados de IgE e IgG4 específicas, este método es extensible a los demás isotipos de anticuerpos: IgA, IgA2, IgM, IgD, IgG1, IgG2 e IgG3, así como también a otros tipos de alérgenos, lo que abre nuevas posibilidades para estudiar la evolución de nuevos tratamientos.

Proteomics

Introduction

Proteins are large biomolecules constituted by a sequence of amino acids that perform a wide range of functions within organisms. The proteome is the complete set of proteins that is produced or modified by an organism or system. The proteome also fluctuates from cell to cell and in response to external stimuli. Therefore, proteomics is the science that studies the characterization of the proteome, including the expression, structure, functions, interactions and modifications of proteins at any stage and in any biological sample. Proteomics is a complementary platform to other omics in the study of living organisms⁴³⁻⁴⁵.

Regarding the most common techniques in proteomics, we will focus of the following ones⁴⁶:

1. Protein Quantification. This technique consists in the labelling with isotopes to calculate the amount of proteins in a sample. The most employed labeling strategies are isotope-coded affinity tag (ICAT), stable isotope labeling with amino acids in cell culture (SILAC), tandem mass tag (TMT) and isobaric tag for relative and absolute quantitation (iTRAQ).
2. Structural Analysis. This provides three-dimensional structure of proteins, which helps to understand their biological function. The two major high-throughput techniques used are X-ray crystallography and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy.
3. Protein Purification. It allows the separation of a protein from a complex mixture. The conventional techniques for purification of proteins are chromatography-based such as ion exchange chromatography (IEC), size exclusion chromatography (SEC) and affinity chromatography. First of all, the sample is passed through a chromatographic column, after different washing steps the unspecific substances are removed from the column and finally the protein of interest is eluted from the column.

4. Protein Analysis. This approach aims to observe different properties of a specific protein. In the analysis of these proteins, the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and western blot are commonly used.

5. Protein Characterization. This is used for the analysis of the protein composition in a sample. In this approach, the first step is the separation of the proteins in the complex sample and then the analysis of the fraction containing the protein of interest. The main separation techniques are sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) and two-dimensional differential gel electrophoresis (2D-DIGE). Regarding the analysis of the fraction, it is usually performed by mass spectrometry (MS) as it has great sensitivity.

6. Protein Sequence Analysis. This technique aims to study the amino acid sequence that forms a protein. One example is the Edman degradation technique.

After mentioning the main techniques in proteomics, we will now revise the applications of these techniques, mainly in the biomedical research field.

1. Protein expression profiling. This is useful in the identification of biomarkers for the underlying processes triggered in a disease, i.e. the expression of different proteins in a signal transduction mechanism.
2. Structural proteomics. It is commonly used in cell biology studies, for example in the analysis of the protein composition of organelles and cellular protein complexes.
3. Post-translational modifications. The analysis of post-translational modifications is helpful to detect several types of modifications that proteins suffer after their synthesis, such as glycosylation, phosphorylation or ubiquitination.
4. Protein-protein interactions. This application is concerned with the way proteins interact with each other, by which mechanisms, bonds, conformations, etc.
5. Functional proteomics. This area links a specific protein structure with its main function. This can be studied by affinity-purified protein complexes or by using mouse knockouts for example.
6. Proteome Mining is a key application in biomedical research which includes new drug discovery, target identification and target validation.

By using different “omics” techniques, it is possible to understand better a biological system or a disease, since applying multiple approaches will lead to complementary data that will ultimately provide a global picture of the situation. Therefore, in recent years it is becoming more decisive to apply more than one omic technique and to integrate them together to achieve a better understanding of biomedical challenges.

Objective

To establish and apply a method to measure the changes in relative distribution of allergen-specific antibody isotypes (IgE and IgG4) in serum at different time points during immunotherapy with SLIT or SCIT treatments by quantitative mass spectrometry (LC-MS/MS).

Materials and Methods for proteomics

Recruited samples

From a previous clinical trial regarding subcutaneous immunotherapy (SCIT) and sublingual immunotherapy (SLIT) in allergic patients⁵¹, 8 serum samples were randomly selected. These samples consisted in (4 + 4) SLIT and SCIT serum treatments. In the trial, patients were followed for 15 months and samples were obtained at 7 time-points: 2 months before the trial started and 1, 3, 7, 10, 12 and 15 months after starting the trial (**Figure 24**). The Danish Ethics Board approved the study, and all subjects signed informed consents before performing any study procedure.

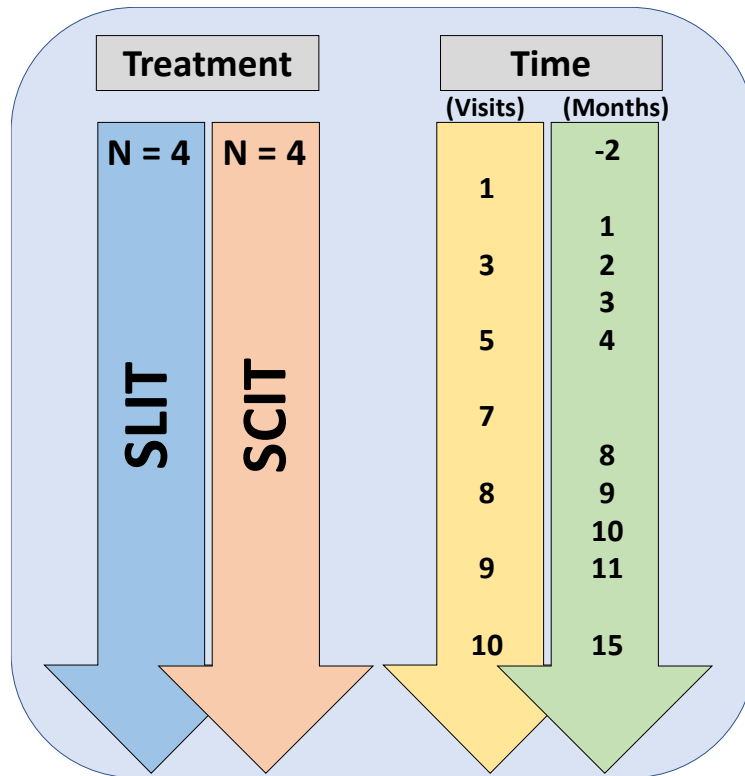


Figure 24. Clinical trial scheme.

Experimental analysis protocol

All allergen-specific antibodies in the sera samples were enriched by binding to biotin-conjugated allergens and captured by magnetic beads. Protein eluates were digested to peptides and labeled with Tandem Mass Tags (TMT, Thermo). The labeled peptides from the different time points (7 samples) of one patient were mixed in a single tube and analyzed with LC-MS/MS (Q-Exactive, Thermo). Data analysis was carried out using Proteome Discoverer (Thermo) software. The complete methodology is carried out in two days. The detailed procedure is fully described below.

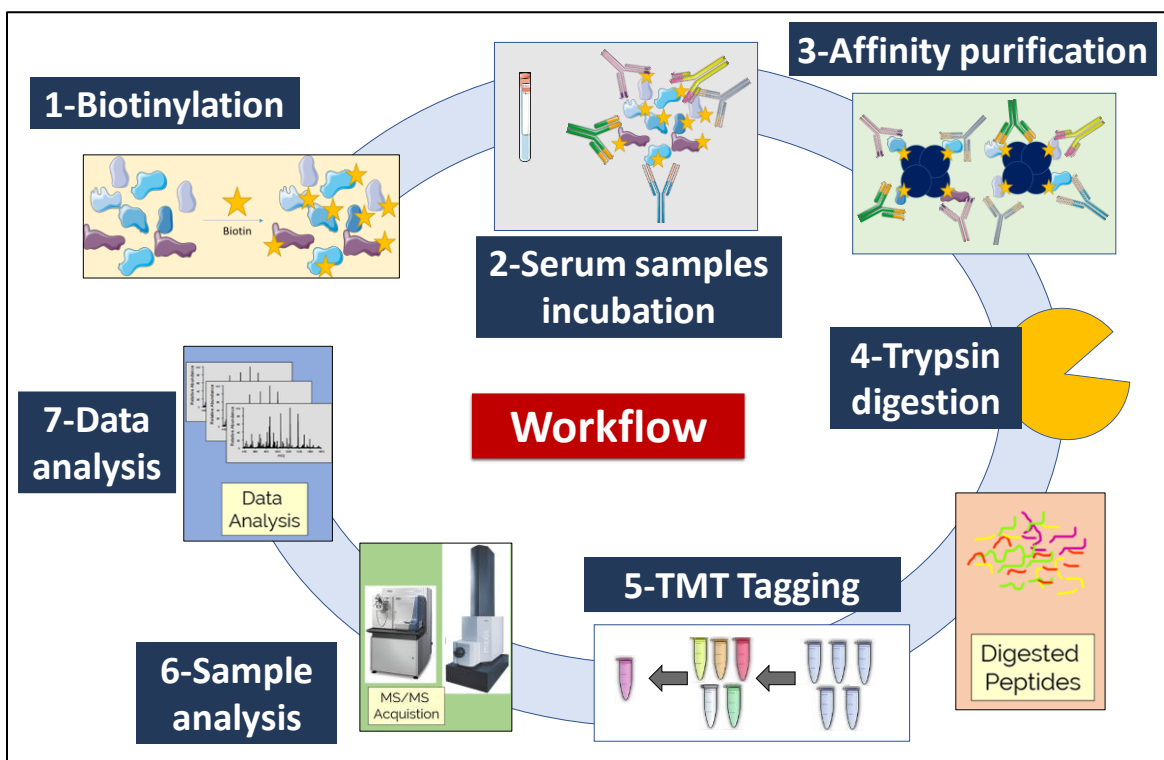


Figure 25. Workflow.

DAY 1: Purification of specific antibodies in serum using magnetic beads

Prewash of streptavidin beads:

- 25 and 50 µl of streptavidin beads were added to 150 µl wash buffer and vortexed.
- Samples were placed inside a magnet for 2 min.
- The supernatant was removed and 200 µl of wash buffer were added to the particles and vortexed.
- Samples were placed inside a magnet for 2 min.
- The supernatant was discarded.

Removal of unspecific binding:

- 250 µl of serum (approx. 50 kU/l) were added to 25 µl of prewashed beads and 550 ml of wash buffer were added to ensure the liquid movement.
- Samples were incubated 30 min at room temperature on rotation mixer.
- Samples were placed inside a magnet for 2 min.
- Serum was transferred to a clean Eppendorf vial.

Intermediate procedure:

- Approximately 2 µg of purified biotin-labelled allergen (Phl p 1 and Phl p 5) were added to the serum.
- Samples were incubated 15 min at room temperature on thermomixer at 400 rpm.
- The serum with the biotinylated allergen was transferred to 50 µl washed beads.
- Samples were incubated 2 hours at room temperature on rotation mixer.
- Samples were placed inside a magnet for 2 min.
- The supernatant was aspirated off and discarded.
- Beads were washed in 1 ml of wash buffer and incubated for 8 min on rotation mixer.
- Samples were placed inside a magnet for 2 min.
- The washing step was repeated 2 more times.
- After the 2 min in the magnet, supernatant was aspirated off and transferred to a new Eppendorf vial.
- 50 µl of guanidine – hydrochloride (Gnd-HCl) were added and the samples were incubated 10 min at 99 °C in thermomixer at 800 rpm.
- Samples were placed inside a magnet for 2 min.
- The supernatant was transferred to a new 1.5 ml Eppendorf vial.
- The beads were washed one more time with 20 µl 25 mM NH_4HCO_3 by mixing the vial on vortex mixer.
- Samples were placed inside a magnet for 2 min.
- The supernatant was added to the vial with Gnd-HCl eluate.

Trypsin digestion:

- 17,5 µl of 45 mM DTT were added to 70 µl sample (Gnd-HCl eluate and NH₄HCO₃ wash).
- Samples were incubated for 15 min at 56 °C in thermomixer at 300 rpm.
- Samples were cooled to room temperature.
- 17,5 µl 100 mM of Iodoacetamide were added to the sample.
- Samples were incubated 15 min at room temperature in the dark.
- 350 µl of water (MS grade) were added to the sample.
- 3 µl trypsin (1 µg/µl) were added to the sample.
- Samples were digested overnight at 37 °C in thermomixer at 300 rpm.

DAY 2: Labeling with TMT.

Clean up peptides

1. The pH value of the samples was lowered to approximately pH 2 by adding around 20 µl of 10% trifluoroacetic acid (TFA) in water.
2. To remove precipitate, samples were centrifuged for 5 min at 12700 rpm and 25°C.

Preparation of Sep-Pak columns:

3. The Sep-Pak Column (Waters) were pre-wetted by adding 2 times 1 ml of 100% acetonitrile.
4. The columns were washed by adding 2 times 0.5 ml 0.1 % TFA in water.
5. The digested samples were loaded to the columns.
6. The columns were washed by adding 3 times 1ml water. The pH of the flow through was measured with a pH strip to approximately 5, the same as the water used for washing. The Sep-Pak columns were placed at 4°C.

TMT tagging

7. Sep-Pak columns were eluted with 350 µl 40% ACN and 350 µl 60% ACN.
8. Samples were dried at 60°C using speed-vacuum.
9. Peptides were dissolved in 110 µl of water.
10. 110 µl of 100% ACN were added to the sample.
11. TEAB to a total concentration of 50mM was added to ensure the reaction. pH should be ~8.
12. TMT reagents were prepared.
13. Each TMT reagent was added to the correct sample. Each TMT reagent was added to a different time point sample for each patient.
14. After 1 hour at room temperature, the samples were quenched by adding 1% hydroxylamine (1:1 hydroxylamine:TMT).
15. Samples were incubated for 15 min at room temperature to stop free TMT from reacting with peptides from other time points of the samples.

16. The set of samples from one patient (combining all the time points of the samples from the same patient) were pooled.
17. Samples were acidified with 10% TFA, and pH was checked to be <2.
18. Samples were frozen until next day (-20°C).

Storage until measurement

19. The samples were dried at 45°C using speed-vacuum.
20. Samples were loaded on small Sep-Pak columns (activated prior to sample load with 2 times, 300 µl 100% ACN, 300 µl 50% ACN + 0.1% formic acid (FA), and equilibrated with 2 times 300 µl 0.1%FA).
21. Sep Pak columns were washed 4 times with 300 µl of 0.1% FA.
22. Samples were stored at 4°C until measurement on LC-MS/MS.

LC-MS/MS analysis

For the analysis, samples were sent to the mass spectrometry service at Copenhagen University. Samples were measured using a Q Exactive HF-x Orbitrap Mass Spectrometer (Thermo). Analytical conditions are private.

Results from proteomics

Optimization of the protocol for allergen-specific antibody isotypes determination.

As a starting point, a protocol for the purification of allergen-specific antibodies was provided by ALK (Hørsholm, Denmark). In this protocol, the allergen-specific antibodies in the sera samples are enriched by binding to biotin-conjugated allergens and captured by magnetic beads. Then, the protein eluates are digested to peptides and labeled with TMT reagents. The labeled peptides are subsequently analyzed with LC-MS/MS. This protocol was developed using Der p 2, a major allergen of house dust mites (HDM). The limitations of this methodology were: first, the uncertainty of the complete purification of allergen-specific antibodies. Secondly, some proteins produced unspecific bindings, generating noise in the data treatment. Third, as the method was set up using only Der p 2, it was unknown if it was extensible to other allergens. Finally, although the success of

the TMT reaction was proved, it was not clear whether all peptides were reacting. Thus, the optimization of this method was performed to overcome these limitations.

To achieve this optimization, more allergens were included: Phl p 1, Phl p 5 and Phl p 6, as well as Der p 2, as it can be seen in **figure 26a** in an electrophoresis gel. We decided to use Der p 2, Phl p 1 and Phl p 5, as they are the major allergens in HDM and grass pollen allergy, respectively. These three are commonly measured in diagnostic tests, as their levels of specific IgE in blood are the highest. On the other hand, Phl p 6 is not a major allergen, but it was chosen to test if the methodology was capable of purifying specific antibodies to allergens in lower concentrations. It was also decided to use an extract of Phl p X (formed by the mixture of Phl p 1, Phl p 5 and Phl p 6), to test the capability to separate the specific antibodies from the different allergens.

These allergens were tested using the initial protocol. Afterwards, the complete binding of all the biotinylated allergens to the streptavidin beads was confirmed running an electrophoresis gel stained with silver as it can be seen in **figure 26b**.

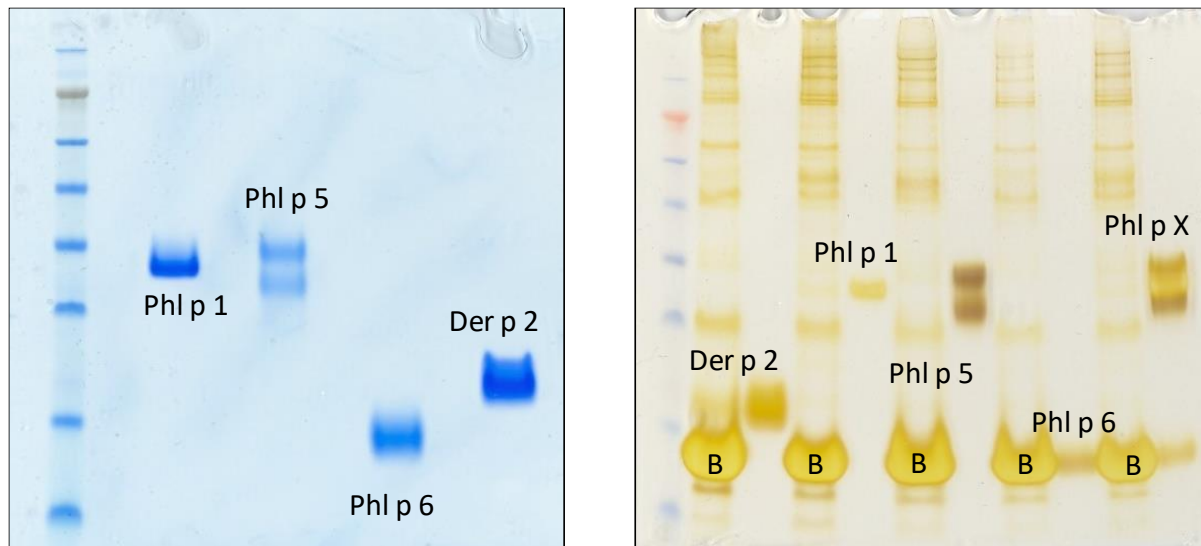


Figure 26. Electrophoresis gels of biotinylated allergens used during the optimization of the protocol: Phl p 1, Phl p 5, Phl p 6, Der p 2; **a)** The allergens without beads **b)** Silver stained gel of the allergens (including Phl p X) with 50 μ l streptavidin beads (B) in the incubation step.

In order to test the selectivity of the protocol, a serum sample of a patient allergic only to HDM and one only to grass pollen were used. After the application of the protocol, the sample from the HDM allergy did not present grass pollen-specific antibodies, and the sample from the grass pollen allergy did not show Der p 2 specific antibodies either.

Once allergens were selected and selectivity was proved, the following parameters were studied for the optimization of the protocol. These are highlighted in Figure 27.

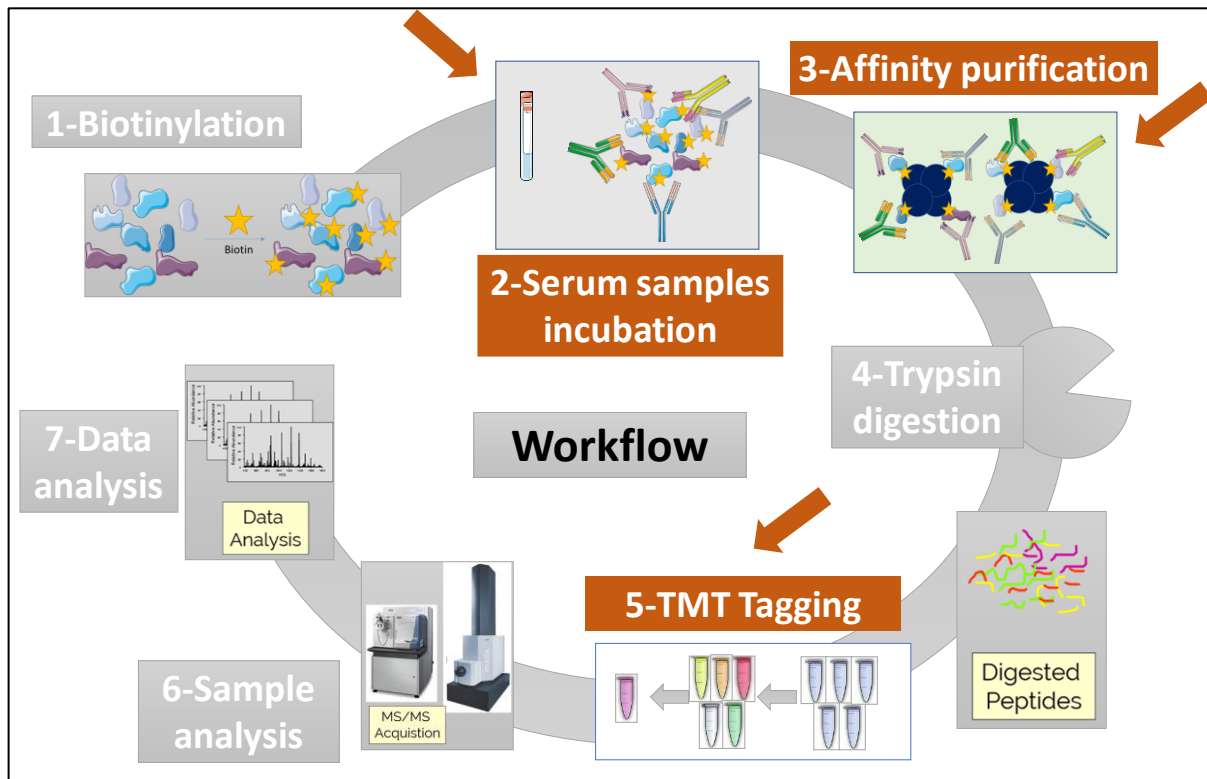


Figure 27. Optimized steps are highlighted in color.

Regarding the protocol the three main steps that were optimized were: (1) the serum sample incubation, (2) affinity purification and (3) TMT tagging.

In the case of serum sample incubation, the amount of biotinylated allergen to be used was tested in order to confirm full binding of the allergens with the specific antibodies. For this purpose, 1 μ g, 1.5 μ g and 2 μ g of biotinylated allergen were tested. The specific

antibodies were measured by LC-MS/MS, where at 2 µg of biotinylated allergen, higher scores for the specific antibody peptides were obtained (data not shown).

A second test in the “serum sample incubation” step was the optimization of the amount of streptavidin beads to be used in two steps: in the pre-incubation and in the incubation of the serum. The beads at the pre-incubation step are needed to pull-down unspecific bindings from the serum, while the beads at the incubation step are used for the specific proteins. The amounts of beads tested in both steps were 25, 50 and 100 µl. For the analysis of pre-incubation step, the beads from these samples were directly digested into peptides and analyzed by LC-MS/MS. The results showed that the amount of unspecific bindings was the same regardless the amount of beads. Therefore, the minimum amount of beads was chosen for pre-incubation step (25 µl). In the case of the incubation step, it was observed that with 50 µl of beads was enough to pull-down the complete binding of all the biotinylated allergens. This is shown in figure **26b**.

Furthermore, we also tested the type of beads: streptavidin or magnetic to be used in the protocol. The **figure 28a-b** shows the relative signal of one of the most abundant protein in the serum, which binds unspecifically to the beads with the biotinylated allergens. As can be observed, the magnetic beads in **figure 28b** pull-down less unspecific bindings and therefore were selected.

Regarding the “affinity purification” stage, an additional washing step after incubation of the serum was tested. The **figure 28c**, shows the relative signal of the unspecific binding protein adding the additional washing step. The result demonstrated a decrease of the relative abundance compared to the one without an additional washing step (figure 28b) and because of that, the additional washing step was incorporated to the protocol.

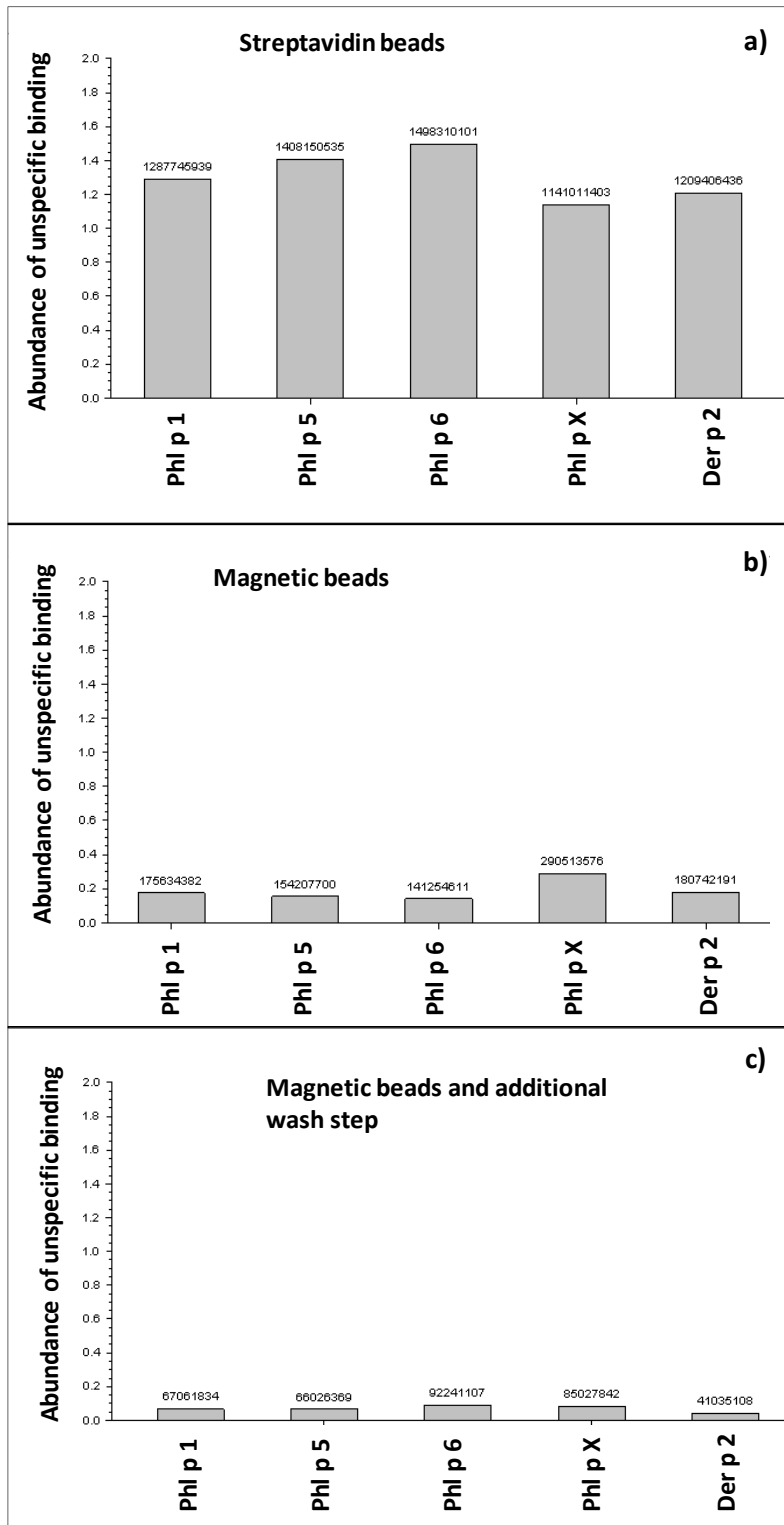


Figure 28. Results of the relative signal of one of the most abundant protein in the serum, which binds unspecifically to the beads with the biotinylated allergens in different

conditions for the protocol optimization: **a)** using streptavidin beads; **b)** using magnetic beads; **c)** using magnetic beads and an additional washing step.

Finally, in the “TMT labelling” stage, the TMT10plex™ Isobaric Label Reagent Set (10plex) was used applying the manufacturer specifications. The 10plex reagents are specific isotopes, which attach to peptides. In this way, they allow the semi-quantitation of the peptides in each single sample. Therefore, in order to ensure the complete tagging of the peptides, the double volume of 10plex reagents was tested. The results showed higher scores of the specific peptides, and because of that, double volume of 10plex reagents implemented.

To sum up, 2 µg of biotinylated allergen and magnetic beads were chosen with 25 µl for the pre-incubation and 50 µl for the incubation of the serum. Moreover, an additional washing step and a double volume of 10plex reagents were implemented in the protocol.

Application of the method in the clinical trial samples

Regarding the application of the optimized protocol to the clinical samples of patients with grass pollen allergy, Phl p 1 and Phl p 5 were used only, as they are the major allergen of grass pollen. In this project, the clinical samples consisted of eight patients, each one with 7 visits during immunotherapy, half of them with SLIT or SCIT treatment, leading to n=56 as the total number of samples. The optimization of this protocol allowed to measure and quantitation of the different isotypes of specific antibodies from the 7 different time points in a single tube and in a single run. The experiment was analyzed in blind without known the treatment. Moreover, each sample was analyzed twice in LC-MS/MS in order to assess the analytical variability.

Unfortunately, one of the samples from the SCIT treatment did not pass the quality control, as the signals corresponding to the half of the labeled peptides were close to baseline. Therefore, this sample was removed from the study.

After analysis of all samples by LC-MS/MS, the quantity of specific IgE and IgG4 were obtained. The FC was calculated using the visit before starting the treatment, as the

baseline for each patient. These FC were represented during the treatments in a graphic as it can be seen in **figure 29** for IgE and IgG4, respectively. In this figure, the treatment with SLIT for half of patients induces an increment of specific IgE after 1 month of treatment was observed compared to SCIT treatment. In addition, the specific IgG4 of Phl p 1 and Phl p 5, increases for both types of treatment with a slightly greater response for treatment with SCIT.

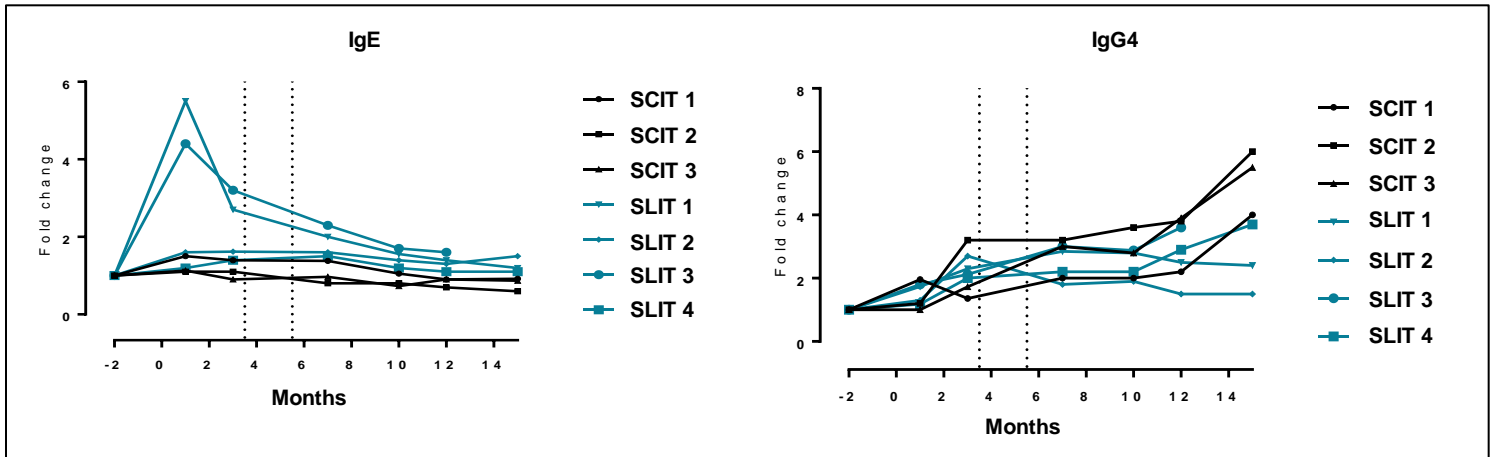


Figure 29. FC of specific IgE and IgG4 for Phl p 1 and Phl p 5 of patients during SLIT or SCIT immunotherapy by LC-MS/MS.

Complementary to the optimized protocol by LC-MS/MS, immunoCAP a standard method that measures specific antibodies of different allergens in independent samples was applied in ALK to the samples. In the same way as before the calculation of FC for each patient was performed. Their FC were depicted in a graphic during the treatments for IgE and IgG4, respectively (**figure 30**). The results by immunoCAP showed the same trends as the optimized method by LC-MS/MS.

Summarizing, the optimized protocol by LC-MS/MS was successfully applied to clinical samples from allergic patients to grass pollen during SLIT or SCIT treatments. The results of this new methodology are in accordance with the standard method using immunoCAP.

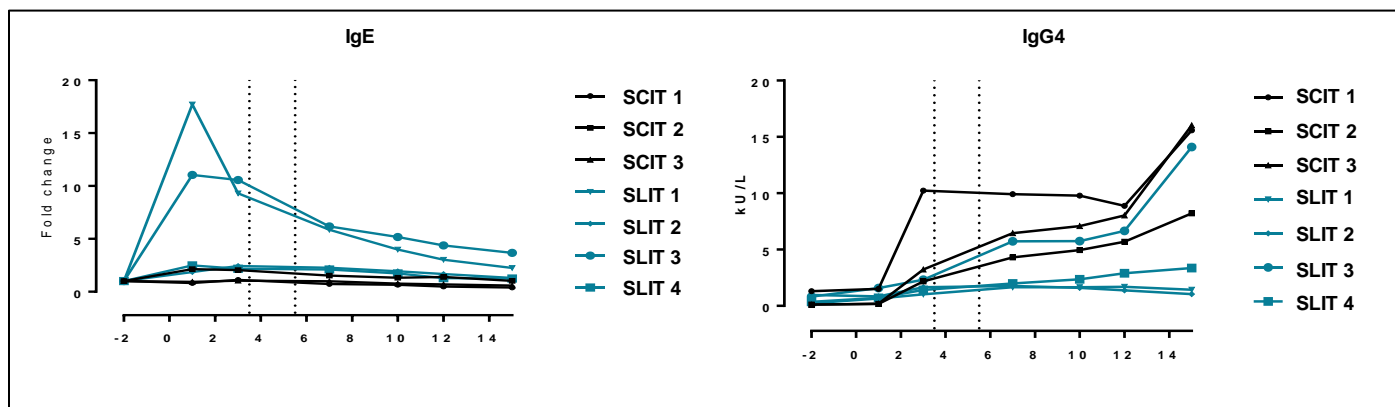


Figure 30. FC of specific IgE and IgG4 for Phl p 1 and Phl p 5 of patients during SLIT or SCIT immunotherapy by immunoCAP.

Discussion

Up to date, immunotherapy is the only treatment that has proved to be effective against allergy. In addition, immunotherapy is a long treatment that last between three to five years. Therefore, the development of methods that might allow monitoring the changes in the immune response are necessary.

The current methods that measure the specific antibodies such as immunoCAP which has some limitations as this method offers only semi-quantitative measurements, presents low linear range and high cost per assay. Moreover, immunoCAP shows high experimental variability as each sample is measured individually. This issue is even bigger comparing results from different laboratories. Based on this, an alternative quantitative methodology by LC-MS/MS was develop and optimize.

During the optimization, critical stages such as the (1) serum sample incubation, (2) affinity purification and (3) TMT tagging were improved. The selection of magnetic beads and the amount used (25 μ l for the pre-incubation and 50 μ l for the serum incubation), and the quantity of biotinylated allergen (2 μ g) permitted the complete pull-down of the

specific antibodies from the samples with the minimal contamination. Moreover, the additional washing step also contributed to minimize the contamination by reducing the unspecific bindings. Finally, the addition of double amount of TMT reagents ensured the complete reaction of the peptides with the reagents.

These optimized parameters resulted in high sensibility, lower contamination levels and higher efficiency in each stage of the protocol. As a result, a reliable protocol for the measurement of different isotypes of specific antibodies was obtained and was ready to be applied in clinical samples.

Afterwards, the optimized method was applied to samples from a clinical trial from patients with allergy to grass pollen, which were subjected to either SLIT or SCIT immunotherapy for 12 months. By using the LC-MS/MS methodology, we were able to measure in a single tube and a single run, the 7 visits from each patient.

The trajectories of specific IgE and IgG4 for Phl p 1 and Phl p 5 for both treatments were obtained (**figure 29**). The treatment with SLIT showed a subset of patients with a large initial response in specific IgE compared to the treatment with SCIT. These results are in consonance with a previous study⁵¹. This change has been related with the desensitization to the allergens. Moreover, we observed a maintained increase of specific IgG4 for both types of treatment although a slight increment in response for treatment with SCIT was observed. This response was recently evaluated in a clinical trial with grass pollen allergic patients during 3 years of immunotherapy plus 2 years of follow up⁸⁸. The authors proposed that the change observed in IgG4 was due to the establishment of tolerance to the allergens.

Nevertheless, the results obtained were in agreement with the published literature, our current method was compared with the standard method using immunoCAP. The trajectories of specific IgE and IgG4 were very similar. However, the LC-MS/MS method offers some advantages, such as, it requires a smaller amount of serum/plasma compared to immunoCAP, and it allows simultaneous measurements of several specific antibody isotypes of allergens, reducing the variability and the errors.

Although the number of patients was low in the application of the protocol, the future purpose is to validate these findings using a new cohort of samples to validate it.

Although the specific antibodies measured were IgE and IgG4, this methodology is extensible to the other immunoglobulin isotypes – IgA, IgA2, IgM, IgD, IgG1, IgG2 and IgG3 –, and to other types of allergens, opening new possibilities to study new treatments.

Conclusions

To sum up, this work has shown that finding suitable clinical models of allergy disease progression – in particular, identifying homogeneous severe allergic phenotypes, which are critical to understand allergy evolution – is not an easy task. We took advantage of the unique model that these grass-pollen-allergic patients represent –those that reside in high pollen exposure areas who develop severe food allergic profilin-mediated reactions– . These reactions identify a group of patients with a severe allergic phenotype that apparently lose tolerance to the allergen.

The main aim of this work was both to identify potential biomarkers as well as to understand underlying causes for severity progression. We used a metabolomics approach and we generated a model for patient classification.

In this work, we have established a classification based on the metabolic profile of the patients. First, we included non-allergic subjects and identified severe allergic phenotypes by their clinical history and their response to the oral challenge test with pure profilin. By using these two extreme phenotypes, we obtained a mathematical algorithm that was used to refine the clinical classification of the “non-severe profilin-allergic patients” into three groups. The first one –with a profile closer to the “non-allergic” group– was named “mild”, the second –with a profile closer to the “severe” group– was introduced into the “severe” group, and the rest were included in a group named “moderate”. This allowed us to analyze the evolution of allergic inflammation along severity. Interestingly and unexpectedly, all patients that were clinically classified as severe shared common metabolomic and transcriptomic profiles, thus confirming the correlation between clinical and metabolomic classification.

Marked changes in energy metabolism were also shown. There is an altered consumption of glucose and other sugars, which are metabolized into lactate in the presence of oxygen. In agreement with our results, existing omics-based studies have reported that immune cells change their metabolism to cope with the increasing demand resulting from the need to synthesize biological precursors. This is known as “aerobic glycolysis” or “Warburg metabolism” and has been described in cancer cells, asthma and inflammation.

Analyzing lipid metabolism, we observed a progressive increase of some fatty acids (oleic and palmitic acids) among allergic phenotypes. Meanwhile, other acids were decreased in the intermediate phenotypes (“mild” and “moderate”) but increased in the “severe” group (myristic and lauric acids). Furthermore, a reduction in carnitines in “severe” compared to “mild” was also observed. One explanation for these results is that, instead of the normal trafficking of fatty acids into the cells for beta-oxidation, they are likely being used for the synthesis of inflammatory mediators. Perhaps, the most interesting metabolomic signature is related to sphingolipids. We detected a progressive increase of S1P – a key mediator that exerts multitude of effects in different tissues – with severity.

These findings open up the possibility for considering new intervention strategies oriented to the stabilization of inflammation/repair systems, e.g. by using supplement-based interventions to replenish metabolic precursors that are highly consumed. Altered energy metabolism could also constitute a pharmacological target.

Regarding proteomics, the results of the kinetics of the specific-IgE and IgG4 were correlated with immunoCAP measurements. The developed method offers a new approach to measure allergen specific antibodies in different time points with some advantages: it only requires a small amount of serum or plasma – between 100 and 200 μ l – and it allows simultaneous measurements of several specific antibody isotypes of allergens, reducing the experimental variability and the error.

The results of specific IgE and IgG4 were shown. However, this method is extensible to other antibodies isotypes – IgA, IgA2, IgM, IgD, IgG1, IgG2 and IgG3 –, and to other types of allergens, opening new possibilities to study the evolution of new treatments.

Lista de publicaciones científicas

1º- **Obeso, D.**; Mera-Berriatua, L.; Rodríguez-Coira, J.; Rosace, D.; Fernández, P.; Martín-Antoniano, I. A.; Santaolalla, M.; Marco Martín, G.; Chivato, T.; Fernández-Rivas, M.; Ramos, T.; Blanco, C.; Alvarado, M. I.; Domínguez, C.; Angulo, S.; Barbas, C.; Barber, D.; Villaseñor, A.; Escribese, M. M., Multi-omics analysis points to altered platelet functions in severe food-associated respiratory allergy. *Allergy* **2018**, *73* (11), 2137-2149.

2º- Villaseñor, A.; Rosace, D.; **Obeso, D.**; Pérez-Gordo, M.; Chivato, T.; Barbas, C.; Barber, D.; Escribese, M., Allergic asthma: an overview of metabolomic strategies leading to the identification of biomarkers in the field. *Clinical & Experimental Allergy* **2017**, *47* (4), 442-456.

3º- Villaseñor, A.; Rosace, D.; **Obeso, D.**; Pérez-Gordo, M.; Chivato, T.; Barbas, C.; Barber, D.; Escribese, M., Answer to: "Biomarkers in allergic asthma: Which matrix should we use?". *Clinical & Experimental Allergy* **2017**, *47* (8), 1099-1100.

4º- Villaseñor, A.; Aedo-Martín, D.; **Obeso, D.**; Erjavec, I.; Rodríguez-Coira, J.; Buendía, I.; Ardura, J. A.; Barbas, C.; Gortazar, A. R., Metabolomics reveals citric acid secretion in mechanically-stimulated osteocytes is inhibited by high glucose. *Scientific reports* **2019**, *9* (1), 2295.

Referencias

- 1 Ojeda, P., Sastre, J., Olaguibel, J. M., Chivato, T. & 2015, i. p. i. t. N. S. o. t. S. S. o. A. a. C. I. A. Alergológica 2015: A National Survey on Allergic Diseases in the Adult Spanish Population. *J Investig Allergol Clin Immunol* **28**, 151-164, doi:10.18176/jiaci.0264 (2018).
- 2 Pérez, T. C. in *Libro de las enfermedades alérgicas de la Fundación BBVA*. 21-30 (Fundación BBVA).
- 3 de Ocariz, M. L. B. O. in *Libro de las enfermedades alérgicas de la Fundación BBVA*. 61-69 (Fundación BBVA).
- 4 Okada, H., Kuhn, C., Feillet, H. & Bach, J. F. The 'hygiene hypothesis' for autoimmune and allergic diseases: an update. *Clin Exp Immunol* **160**, 1-9, doi:10.1111/j.1365-2249.2010.04139.x (2010).
- 5 Petersen, C. & Round, J. L. Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. *Cell Microbiol* **16**, 1024-1033, doi:10.1111/cmi.12308 (2014).
- 6 Ege, M. J. The Hygiene Hypothesis in the Age of the Microbiome. *Ann Am Thorac Soc* **14**, S348-S353, doi:10.1513/AnnalsATS.201702-139AW (2017).
- 7 Bloomfield, S. F. *et al.* Time to abandon the hygiene hypothesis: new perspectives on allergic disease, the human microbiome, infectious disease prevention and the role of targeted hygiene. *Perspect Public Health* **136**, 213-224, doi:10.1177/1757913916650225 (2016).
- 8 Zubeldia, J. M., Senent, C. J. & Baeza, I. J. t. M. L. *Libro de las enfermedades alérgicas de la Fundación BBVA*. (Fundacion BBVA, 2012).
- 9 León Regal, M. L. *et al.* Inflammatory acute response. Biochemical and cellular considerations. *Revista de Enfermedades no Transmisibles Finlay* **5**, 47-62 (2015).
- 10 Devlin, T. Bioquímica, 4ª edición. Reverté, Barcelona. *editar] Véase también* (2004).
- 11 Nelson, D. L., Lehninger, A. L. & Cox, M. M. *Lehninger principles of biochemistry*. (Macmillan, 2008).

- 12 Villanueva-Pájaro, D. J. & Marrugo-Cano, J. A. Influencia de los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y omega-6 de la dieta y de sus metabolitos en la respuesta inmune de tipo alérgico. *Revista de la Facultad de Medicina* **63**, 301-313 (2015).
- 13 Buczynski, M. W., Dumlao, D. S. & Dennis, E. A. Thematic Review Series: Proteomics. An integrated omics analysis of eicosanoid biology. *J Lipid Res* **50**, 1015-1038, doi:10.1194/jlr.R900004-JLR200 (2009).
- 14 Arita, M. *et al.* Resolvin E1 selectively interacts with leukotriene B4 receptor BLT1 and ChemR23 to regulate inflammation. *J Immunol* **178**, 3912-3917, doi:10.4049/jimmunol.178.6.3912 (2007).
- 15 Serhan, C. N., Yacoubian, S. & Yang, R. Anti-inflammatory and proresolving lipid mediators. *Annu Rev Pathol* **3**, 279-312, doi:10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.151409 (2008).
- 16 Stables, M. J. & Gilroy, D. W. Old and new generation lipid mediators in acute inflammation and resolution. *Prog Lipid Res* **50**, 35-51, doi:10.1016/j.plipres.2010.07.005 (2011).
- 17 Levy, B. D. *et al.* Multi-pronged inhibition of airway hyper-responsiveness and inflammation by lipoxin A(4). *Nat Med* **8**, 1018-1023, doi:10.1038/nm748 (2002).
- 18 Dávila, I., Jáuregui, I., Olaguibel, J. & Zubeldia, J. Tratado de Alergología. *Tomo II* (2015).
- 19 Falcó, S. N. & Galán, C. G. Prevención de las enfermedades alérgicas. (2015).
- 20 Sánchez-Monge, R., Lombardero, M., García-Sellés, F. J., Barber, D. & Salcedo, G. Lipid-transfer proteins are relevant allergens in fruit allergy. *J Allergy Clin Immunol* **103**, 514-519, doi:10.1016/s0091-6749(99)70479-3 (1999).
- 21 Díaz-Perales, A. *et al.* Lipid-transfer proteins as potential plant panallergens: cross-reactivity among proteins of Artemisia pollen, Castanea nut and Rosaceae fruits, with different IgE-binding capacities. *Clin Exp Allergy* **30**, 1403-1410, doi:10.1046/j.1365-2222.2000.00909.x (2000).
- 22 García-Sellés, F. J. *et al.* Patterns of reactivity to lipid transfer proteins of plant foods and Artemisia pollen: an in vivo study. *Int Arch Allergy Immunol* **128**, 115-122, doi:10.1159/000059401 (2002).

- 23 Salcedo, G., Sanchez-Monge, R., Diaz-Perales, A., Garcia-Casado, G. & Barber, D. Plant non-specific lipid transfer proteins as food and pollen allergens. *Clin Exp Allergy* **34**, 1336-1341, doi:10.1111/j.1365-2222.2004.02018.x (2004).
- 24 Cuesta-Herranz, J. *et al.* Differences among pollen-allergic patients with and without plant food allergy. *Int Arch Allergy Immunol* **153**, 182-192, doi:10.1159/000312636 (2010).
- 25 Barber, D. *et al.* Understanding patient sensitization profiles in complex pollen areas: a molecular epidemiological study. *Allergy* **63**, 1550-1558, doi:10.1111/j.1398-9995.2008.01807.x (2008).
- 26 Barber, D. *et al.* Component-resolved diagnosis of pollen allergy based on skin testing with profilin, polcalcin and lipid transfer protein pan-allergens. *Clin Exp Allergy* **39**, 1764-1773, doi:10.1111/j.1365-2222.2009.03351.x (2009).
- 27 Rodríguez Del Río, P. *et al.* Profilin, a Change in the Paradigm. *J Investig Allergol Clin Immunol* **28**, 1-12, doi:10.18176/jiaci.0193 (2018).
- 28 Ruiz-García, M. *et al.* Profilin: a relevant aeroallergen? *J Allergy Clin Immunol* **128**, 416-418, doi:10.1016/j.jaci.2011.03.008 (2011).
- 29 Joenväärä, S. *et al.* Caveolar transport through nasal epithelium of birch pollen allergen Bet v 1 in allergic patients. *J Allergy Clin Immunol* **124**, 135-142.e131-121, doi:10.1016/j.jaci.2008.11.048 (2009).
- 30 Mattila, P., Joenväärä, S., Renkonen, J., Toppila-Salmi, S. & Renkonen, R. Allergy as an epithelial barrier disease. *Clin Transl Allergy* **1**, 5, doi:10.1186/2045-7022-1-5 (2011).
- 31 Hardyman, M. A. *et al.* TNF- α -mediated bronchial barrier disruption and regulation by src-family kinase activation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **132**, 665-675. e668 (2013).
- 32 Leino, M. S. *et al.* Barrier disrupting effects of alternaria alternata extract on bronchial epithelium from asthmatic donors. *PloS one* **8**, e71278 (2013).
- 33 Xiao, C. *et al.* Defective epithelial barrier function in asthma. *Journal of Allergy and Clinical immunology* **128**, 549-556. e512 (2011).

- 34 Rosace, D. *et al.* Profilin-mediated food-induced allergic reactions are associated with oral epithelial remodeling. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **143**, 681-690. e681 (2019).
- 35 Eguiluz-Gracia, I. *et al.* Recent developments and highlights in biomarkers in allergic diseases and asthma. *Allergy* **73**, 2290-2305 (2018).
- 36 Villaseñor, A. *et al.* Allergic asthma: an overview of metabolomic strategies leading to the identification of biomarkers in the field. *Clinical & Experimental Allergy* **47**, 442-456 (2017).
- 37 Bujak, R., Struck-Lewicka, W., Markuszewski, M. J. & Kaliszan, R. Metabolomics for laboratory diagnostics. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **113**, 108-120 (2015).
- 38 Johnson, C. H., Ivanisevic, J. & Siuzdak, G. Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms. *Nature reviews Molecular cell biology* **17**, 451-459 (2016).
- 39 Want, E. J. *et al.* Solvent-dependent metabolite distribution, clustering, and protein extraction for serum profiling with mass spectrometry. *Analytical chemistry* **78**, 743-752 (2006).
- 40 Oberacher, H. *et al.* Annotating Nontargeted LC-HRMS/MS Data with Two Complementary Tandem Mass Spectral Libraries. *Metabolites* **9**, 3 (2019).
- 41 Cambiaghi, A., Ferrario, M. & Masseroli, M. Analysis of metabolomic data: tools, current strategies and future challenges for omics data integration. *Briefings in bioinformatics* **18**, 498-510 (2017).
- 42 Chagoyen, M., López-Ibáñez, J. & Pazos, F. in *Data Mining Techniques for the Life Sciences* 399-406 (Springer, 2016).
- 43 Graves, P. R. & Haystead, T. A. Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**, 39-63 (2002).
- 44 Blackstock, W. P. & Weir, M. P. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends in biotechnology* **17**, 121-127 (1999).
- 45 Anderson, N. L. & Anderson, N. G. Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis* **19**, 1853-1861 (1998).

- 46 Aslam, B., Basit, M., Nisar, M. A., Khurshid, M. & Rasool, M. H. Proteomics: technologies and their applications. *Journal of chromatographic science* **55**, 182-196 (2017).
- 47 Ciborowski, M. *et al.* Metabolomic approach with LC– MS reveals significant effect of pressure on diver’s plasma. *Journal of Proteome Research* **9**, 4131-4137 (2010).
- 48 de la Fuente, A. G. *et al.* Knowledge-based metabolite annotation tool: CEU Mass Mediator. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **154**, 138-149 (2018).
- 49 Garcia, A. & Barbas, C. in *Metabolic Profiling* 191-204 (Springer, 2011).
- 50 Armitage, E. G., Godzien, J., Alonso-Herranz, V., López-González, Á. & Barbas, C. Missing value imputation strategies for metabolomics data. *Electrophoresis* **36**, 3050-3060 (2015).
- 51 Aasbjerg, K. *et al.* Immunological comparison of allergen immunotherapy tablet treatment and subcutaneous immunotherapy against grass allergy. *Clin Exp Allergy* **44**, 417-428, doi:10.1111/cea.12241 (2014).
- 52 Bylesjo, M. *et al.* OPLS discriminant analysis: combining the strengths of PLS-DA and SIMCA classification. *Journal of Chemometrics* **20**, 341-351, doi:10.1002/cem.1006 (2006).
- 53 Loza, M. J. *et al.* Validated and longitudinally stable asthma phenotypes based on cluster analysis of the ADEPT study. *Respiratory research* **17**, 165 (2016).
- 54 Sallis, B. F. *et al.* An algorithm for the classification of mRNA patterns in eosinophilic esophagitis: Integration of machine learning. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **141**, 1354-1364. e1359 (2018).
- 55 Kuo, C.-H. S. *et al.* A transcriptome-driven analysis of epithelial brushings and bronchial biopsies to define asthma phenotypes in U-BIOPRED. *American journal of respiratory and critical care medicine* **195**, 443-455 (2017).
- 56 Nowak-Węgrzyn, A. *et al.* Work Group report: oral food challenge testing. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **123**, S365-S383 (2009).
- 57 Nieman, D. C., Lila, M. A. & Gillitt, N. D. Immunometabolism: a multi-omics approach to interpreting the influence of exercise and diet on the immune system. *Annual review of food science and technology* **10**, 341-363 (2019).

- 58 Venkatesh, K. V., Darunte, L. & Bhat, P. J. Warburg Effect. *Encyclopedia of Systems Biology*, 2349-2350 (2013).
- 59 Loftus, R. M. & Finlay, D. K. Immunometabolism: cellular metabolism turns immune regulator. *Journal of Biological Chemistry* **291**, 1-10 (2016).
- 60 O'Neill, L. A., Kishton, R. J. & Rathmell, J. A guide to immunometabolism for immunologists. *Nature Reviews Immunology* **16**, 553 (2016).
- 61 Lund, G. *et al.* Strong and frequent T-cell responses to the minor allergen Phl p 12 in Spanish patients IgE-sensitized to Profilins. *Allergy* **73**, 1013-1021 (2018).
- 62 Ostroukhova, M. *et al.* The role of low-level lactate production in airway inflammation in asthma. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **302**, L300-L307 (2011).
- 63 Rodrigo, G. & Rodrigo, C. Elevated plasma lactate level associated with high dose inhaled albuterol therapy in acute severe asthma. *Emergency Medicine Journal* **22**, 404-408 (2005).
- 64 Shime, H. *et al.* Tumor-secreted lactic acid promotes IL-23/IL-17 proinflammatory pathway. *The Journal of Immunology* **180**, 7175-7183 (2008).
- 65 Rodríguez-Rodríguez, E. *et al.* Fat intake and asthma in Spanish schoolchildren. *European journal of clinical nutrition* **64**, 1065 (2010).
- 66 Wendell, S. G., Baffi, C. & Holguin, F. Fatty acids, inflammation, and asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **133**, 1255-1264 (2014).
- 67 Arita, M. Eosinophil polyunsaturated fatty acid metabolism and its potential control of inflammation and allergy. *Allergology International* **65**, 2-5 (2016).
- 68 Bennett, M. & Gilroy, D. W. Lipid mediators in inflammation. *Microbiology spectrum* **4** (2016).
- 69 Kulinski, J. M., Muñoz-Cano, R. & Olivera, A. Sphingosine-1-phosphate and other lipid mediators generated by mast cells as critical players in allergy and mast cell function. *European journal of pharmacology* **778**, 56-67 (2016).
- 70 Peyrin-Biroulet, L., Christopher, R., Behan, D. & Lassen, C. Modulation of sphingosine-1-phosphate in inflammatory bowel disease. *Autoimmunity reviews* **16**, 495-503 (2017).

- 71 Saluja, R., Kumar, A., Jain, M., Goel, S. K. & Jain, A. Role of sphingosine-1-phosphate in mast cell functions and asthma and its regulation by non-coding RNA. *Frontiers in immunology* **8**, 587 (2017).
- 72 Pham, T. H. *et al.* Lymphatic endothelial cell sphingosine kinase activity is required for lymphocyte egress and lymphatic patterning. *Journal of Experimental Medicine* **207**, 17-27 (2010).
- 73 Cyster, J. G. & Schwab, S. R. Sphingosine-1-phosphate and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Annual review of immunology* **30**, 69-94 (2012).
- 74 Mendelson, K., Evans, T. & Hla, T. Sphingosine 1-phosphate signalling. *Development* **141**, 5-9 (2014).
- 75 Mendoza, A. *et al.* The transporter Spns2 is required for secretion of lymph but not plasma sphingosine-1-phosphate. *Cell reports* **2**, 1104-1110 (2012).
- 76 Chang, C.-H. & Randolph, G. J. Sphingosine-1-Phosphate as the Lymphocyte's Ticket to Ride and Survive. *Developmental cell* **41**, 576-578 (2017).
- 77 Książek, M., Chacińska, M., Chabowski, A. & Baranowski, M. Sources, metabolism, and regulation of circulating sphingosine-1-phosphate. *Journal of lipid research* **56**, 1271-1281 (2015).
- 78 Cantalupo, A. & Di Lorenzo, A. S1P signaling and de novo biosynthesis in blood pressure homeostasis. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **358**, 359-370 (2016).
- 79 Wang, H.-C. *et al.* Aryl hydrocarbon receptor signaling promotes ORMDL3-dependent generation of sphingosine-1-phosphate by inhibiting sphingosine-1-phosphate lyase. *Cellular & molecular immunology*, 1 (2018).
- 80 White, C., Alshaker, H., Cooper, C., Winkler, M. & Pchejetski, D. The emerging role of FTY720 (Fingolimod) in cancer treatment. *Oncotarget* **7**, 23106 (2016).
- 81 Vito, C. D. *et al.* Platelet-derived sphingosine-1-phosphate and inflammation: from basic mechanisms to clinical implications. *Platelets* **27**, 393-401 (2016).
- 82 Wedman, P., Aladhami, A., Chumanevich, A., Fuseler, J. & Oskeritzian, C. Mast cells and sphingosine-1-phosphate underlie prelesional remodeling in a mouse model of eczema. *Allergy* **73**, 405-415 (2018).

- 83 Trinh, H. K. T. *et al.* Exploration of the sphingolipid metabolite, sphingosine-1-phosphate and sphingosine, as novel biomarkers for aspirin-exacerbated respiratory disease. *Scientific reports* **6**, 36599 (2016).
- 84 Oskeritzian, C. A. *et al.* The sphingosine-1-phosphate/sphingosine-1-phosphate receptor 2 axis regulates early airway T-cell infiltration in murine mast cell-dependent acute allergic responses. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **135**, 1008-1018. e1001 (2015).
- 85 Ried, J. *et al.* Integrative genetic and metabolite profiling analysis suggests altered phosphatidylcholine metabolism in asthma. *Allergy* **68**, 629-636 (2013).
- 86 Jung, J. *et al.* Serum metabolomics reveals pathways and biomarkers associated with asthma pathogenesis. *Clinical & Experimental Allergy* **43**, 425-433 (2013).
- 87 Rumbaut, R. E. & Thiagarajan, P. Platelet-vessel wall interactions in hemostasis and thrombosis. *Synthesis Lectures on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function* **2**, 1-75 (2010).
- 88 Varona, R. *et al.* Persistent regulatory T-cell response 2 years after 3 years of grass tablet SLIT: Links to reduced eosinophil counts, sIgE levels, and clinical benefit. *Allergy* **74**, 349-360, doi:10.1111/all.13553 (2019).

